

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

Identifier: AAF82118 cDNA Sequence 1060 BP

Release Info: Derwent Geneseq Database Release No. 200124; Date released 26-NOV-01

Database WPI; 2001-303742/32.;P-PSDB; AAB74934.  
XReference:

Accession AAF82118  
Number:

Patent Title: TSA7005 gene, encoding a polypeptide useful for the diagnosis and treatment of diseases associated with its expression

Patented by: (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD.

Inventor:

Description: Human TSA7005 protein encoding cDNA SEQ ID NO:3.

Patent Number: JP2001025389-A

Patent Publication 30-JAN-2001  
Date:

Modification 27-JUN-2001 (first entry)  
Date:

Local Filing: 15-JUL-1999; 99JP-0201279

Priority: 15-JUL-1999

Abstract: The present sequence encodes a human TSA7005 protein which shares 32% homology with human and mouse and 34% homology with the rat Reg protein. TSA7005 has pancreatic beta cell growth activity and hypoglycaemic activity. The TSA7005 protein can be used for the diagnosis and treatment of diseases associated with the gene and its expression.

KeyWords: Human;TSA7005;Reg;pancreatic beta cell growth;hypoglycaemic;diagnosis;ss.

Organism: Homo sapiens.

Sequence Composition: Sequence 1060 BP; 269 A; 278 C; 247 G; 264 T; 2 other;

Sequence: >AAF82118 JP2001025389-A PA (SAKA ) PR 15-JUL-1999 PF 15-JUL-1999 Human TSA7005 protein encoding cDNA SEQ ID NO:3. [Homo sapiens.]

```
TTCAAAGAACGCTAGTAAGGTCTCTGAGATCCTGCACTAGCTACATCCTCAGGGTAGG
AGGAAGATGGCTTCCAGAACGATGCGGCTGCTCCTATTGCTGAGCTGCCTGGCCAAAACA
GGAGTCCTGGGTGATAATCATCATGAGAACCCAGCTGTGCTCCTGGATGGTTTACCAACAG
TCCAATTGCTATGGTTACTTCAGGAAGCTGAGGAACCTGGCATCTATCCTGAGTTAAAGGAAGCCAGCACC
CAGTCTTACGGAAACGGAGCCCACCTGGCATCTATCCTGAGTTAAAGGAAGCCAGCACC
ATAGCAGAGTACATAAGTGGCTATCAGAGAACGCCAGCCGATATGGATTGGCCTGACCGAC
CCACAGAACAGGAGCAGTGGCAGTGGATTGATGGGCCATGTATCTGTACAGATCTGG
TCTGGCAAGTCCATGGGTGGAACAAGCACTGTGCTGAGATGAGCTCCAATAACAACCTT
TTAACTTGGAGCAGCAACGAATGCAACAAGCGCCAACACTTCCTGTGCAAGTACCGACCA
TAGAGCAAGAACATTCTGCTAACTCCTGCACAGCCCCGTCTTCCCTTCTGCTA
GCCTGGCTAAATCTGCTCATTATTCAGAGGGAAACCTAGCAAACTAAGAGTGATAAGG
GCCCTACTACACTGGCTTTAGGCTTAGAGACAGAAACCTTACGATTGGCCAGTAGT
GGCTTCTAGCTCTAAATGTTGCCCCCCATCCCTTCCACAGTATCCCTCTTCCCTCCT
CCCCTGTCTCTGGCTGTCTCGAGCAGTCTAGAACAGAGTGCATCTCCAGCCTATGAAACAGC
TGGGTCTTGGCCATAAGAACGAAAGATTTGAAGACAGAACAGGAAGAAACTCAGGAGTAAG
CTTCTAGMCCCCCTCAGCTTCTACACCCCTCTGCCCTCTCCATTGCCCTGCACCCACC
CCAGCCACTCAACTCCTGCTTGTGTTTCCCTTGGCCATRGGAAGGTTACCAAGTAGAATC
CTTGCTAGGTTGATGTGGGCCATACATTCTTAATAAAA
```

Identifier: AAB74934 Protein Sequence 158 AA

Release Info: Derwent Geneseq Database Release No. 200124; Date released 26-NOV-01

Database WPI; 2001-303742/32.;N-PSDB; AAF82117, AAF82118.  
XReference:

Accession AAB74934  
Number:

Patent Title: TSA7005 gene, encoding a polypeptide useful for the diagnosis and treatment of diseases associated with its expression.

Patented by: (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD.

Inventor:

Description: Human TSA7005 protein SEQ ID NO:1.

Patent Number: JP2001025389-A

Patent Publication 30-JAN-2001

Date:

Modification Date: 27-JUN-2001 (first entry)

Local Filing: 15-JUL-1999; 99JP-0201279

Priority: 15-JUL-1999

Abstract: The present sequence represents a human TSA7005 protein which shares 32% homology with human and mouse and 34% homology with the rat Reg protein. TSA7005 has pancreatic beta cell growth activity and hypoglycaemic activity. The TSA7005 protein can be used for the diagnosis and treatment of diseases associated with the gene and its expression.

KeyWords: Human;TSA7005;Reg;pancreatic beta cell growth;hypoglycaemic;diagnosis.

Organism: Homo sapiens.

Sequence: Sequence 158 AA; 10 A; 10 R; 9 N; 4 D; 0 B; 7 C; 8 Q; 6 E; 0 Z; 12 G; 5 H; 8 I; 16 L; 9 K; 6 M; 4 F; 5 P; 19  
Composition: 1 V; 0 Others;

Sequence: >AAB74934 JP2001025389-A PA (SAKA ) PR 15-JUL-1999 PF 15-JUL-1999 Human TSA7005 protein SEQ ID NO:1  
[Homo sapiens.] MASRSMRLLLSSLAKTGVLDIIMRPSCAPGWFYHKSNCYGYFRKLRNWSDAEL  
YGNGAHLASILSLKEASTIAEYISGYQRSQPIWIGLHDPQKRQQWQWIDGAMYLYRSWSG  
KSMGGNKHCAEMSSNNNLTWSSNECNKRQHFLCKYRP

Identifier: AAF82117 cDNA Sequence 474 BP

Release Info: Derwent Geneseq Database Release No. 200124; Date released 26-NOV-01

Database WPI; 2001-303742/32.;P-PSDB; AAB74934.  
XReference:

Accession Number: AAF82117

Patent Title: TSA7005 gene, encoding a polypeptide useful for the diagnosis and treatment of diseases associated with its expression

Patented by: (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD.

Inventor:

Description: Human TSA7005 protein encoding cDNA SEQ ID NO:2.

Patent Number: JP2001025389-A

Patent Publication Date: 30-JAN-2001

Date:

Modification Date: 27-JUN-2001 (first entry)

Local Filing: 15-JUL-1999; 99JP-0201279

Priority: 15-JUL-1999

Abstract: The present sequence encodes a human TSA7005 protein which shares 32% homology with human and mouse and 34% homology with the rat Reg protein. TSA7005 has pancreatic beta cell growth activity and hypoglycaemic activity. The TSA7005 protein can be used for the diagnosis and treatment of diseases associated with the gene and its expression.

KeyWords: Human;TSA7005;Reg;pancreatic beta cell growth;hypoglycaemic;diagnosis;ss.

Organism: Homo sapiens.

Sequence Composition: Sequence 474 BP; 126 A; 116 C; 129 G; 103 T; 0 other;

Sequence: >AAF82117 JP2001025389-A PA (SAKA ) PR 15-JUL-1999 PF 15-JUL-1999 Human TSA7005 protein encoding cDNA SEQ ID NO:2. [Homo sapiens.]

```
ATGGCTTCCAGAACATGCCGCTGCTCCTATTGCTGAGCTGCCTGGCCAAAACAGGAGTC
CTGGGTGATATCATCATGAGACCCAGCTGTGCTCCTGGATGGTTTACCAAGTCCAAT
TGCTATGGTTACTTCAGGAAGCTGAGGAAGCTGGCTGTGATGCCGAGCTCGAGTGTCACT
TACGGAAACGGAGCCCACCTGGCATCTATCCTGAGTTAAAGGAAGGCCAGCACCATAGCA
GAGTACATAAGTGGCTATCAGAGAACGCCAGCCGATATGGATTGCCCTGCACGACCCACAG
AAGAGGCAGCAGTGGCAGTGGATTGATGGGGCATGTATCTGTACAGATCCTGGTCTGGC
AAGTCCATGGTGGGAAACAAGCACTGTGCTGAGATGAGCTCCAATAACAACACTTTAACT
TGGAGCAGCAACGAATGCAACAAGGCCAACACTCCTGTGCAAGTACCGACCA
```

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-25389

(P2001-25389A)

(43)公開日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコト*(参考)
C 12 N 15/09	Z N A	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 07 K 14/47		C 07 K 14/47	4 B 0 6 4
C 12 N 1/15		C 12 N 1/15	4 B 0 6 5
1/19		1/19	4 C 0 8 4
1/21		1/21	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-201279	(71)出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22)出願日	平成11年7月15日 (1999.7.15)	(72)発明者	大河原 剛 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30
		(72)発明者	鈴木 幹生 徳島県徳島市川内町加賀須野463-30
		(72)発明者	尾崎 浩一 徳島県徳島市南末広町2-67 リバーサイ ド南末広7番館606号
		(74)代理人	100065215 弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T S A7005遺伝子

(57)【要約】

【課題】 R e g 蛋白質と相同性を有し、 $\beta$ 細胞増殖活性因子または降血糖因子としての胰臓、小腸、大腸、精巣特異的遺伝子を提供。

【解決手段】 (a)配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖および (b)配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも95%の相同性を持つポリヌクレオチドから選ばれる遺伝子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)または(b)のポリヌクレオチドを含む遺伝子：

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖、(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも95%の相同性を持つポリヌクレオチド。

【請求項2】以下の(a)または(b)のポリペプチドをコードする遺伝子：

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチド、(b) 上記(a)のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ $\beta$ 細胞増殖活性または血糖降下作用を有するポリペプチド。

【請求項3】以下の(a)または(b)のポリヌクレオチドからなる遺伝子：

(a) 配列番号：2で示される塩基配列、(b) 上記(a)の塩基配列のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項4】配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである請求項1に記載の遺伝子。

【請求項5】配列番号：2で示される塩基配列のポリヌクレオチドである請求項3に記載の遺伝子。

【請求項6】請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子を有する組換え体発現ベクター。

【請求項7】請求項6に記載の組換え体発現ベクターを有する宿主細胞。

【請求項8】配列番号：2で示される塩基配列中の少なくとも10の連続するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項9】配列番号：2で示される塩基配列中の少なくとも30の連続するヌクレオチド配列を含む請求項8に記載のポリヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$ 細胞、小腸、大腸、精巣に特異的に発現している新規遺伝子TSA7005、より詳しくは、再生 $\beta$ 細胞でその発現が見られ、イン・ビトロで $\beta$ 細胞の増殖促進が知られているヒト(J. Biol. Chem., 263(5) 2111-2114 (1988)、マウス(J. Biol. Chem., 268(21) 15974-15982 (1993))およびラット(J. Biol. Chem., 263(5) 2111-2114 (1988))のReg蛋白質とそれぞれ3.2%、3.2%および3.4%の相同性を有し、 $\beta$ 細胞増殖活性因子または降血糖因子(抗糖尿病因子)として働くと考えられる、新規な $\beta$ 細胞、小腸、大腸、精巣特異的遺伝子に関する。

【0002】また、本発明は、該遺伝子断片、該遺伝子によってコードされる蛋白質、その特異抗体、該遺伝子

またはその断片を有効成分とする医薬組成物にも関している。

## 【0003】

【従来の技術】分子生物学や発生工学による糖尿病研究の近年の進歩は著しく、インスリン分泌、インスリン作用機構の解明に始まり、最近、特に $\beta$ 細胞におけるグルコース代謝とATP産生などの過程を説明する生理的機能の解明に向けて、研究が進められている。また、分子遺伝学とヒトゲノムプロジェクトの進展により、インスリンとインスリン受容体遺伝子の異常が、糖尿病を惹起するのではないかといわれた10年位前に比べると、現在は、糖尿病の発生に係る多くの疾患原因遺伝子が単離、解明されてきている。

【0004】しかしながら、糖尿病治療の現況は、病態や合併症に対する対処療法が行われているに過ぎず、その根本的予防および治療法の創出が望まれている。

【0005】上記糖尿病の根本的予防および治療法の確立のためには、インスリン分泌作用機構や $\beta$ 細胞の生理的メカニズムの解明に基づく糖尿病のインスリン分泌異常・抵抗性の解明および $\beta$ 細胞の破壊のメカニズムの解明と共に、これら糖尿病発症の分子機構に関与する新たな因子およびこれをコードする遺伝子の発見、単離、それらの作用機序の解明が望まれる。

【0006】現在、上記糖尿病関与因子としては、 $\beta$ 細胞再生因子、例えばReg蛋白、INGAP(islet neogenesis-associated protein)、ニコチニアミド(nicotinamide)、BTC(Betacellulin)などが報告されている。上記ニコチニアミドおよびReg蛋白については、例えば、90%脾切除を行ったラットにおいてポリADPリボース合成酵素の抑制剤であるニコチニアミドの投与により、糖尿病が軽快することが見出され(Yomemura, H., et al., Diabetes, 33, 401 (1984))、該ニコチニアミド投与ラットの残存脾ランゲルハンス氏島は肥大し、インスリンを産生する細胞で占められ、この $\beta$ 細胞の増加によって耐糖能が改善するものと考えられた。このニコチニアミド投与ラットにおいて、発現が増加する遺伝子として、Reg遺伝子が単離された(Terazono, K., et al., J. Biol. Chem., 263(5) 2111-2114 (1988))。該Reg遺伝子は、正常脾では主に外分泌細胞に発現しているが、再生脾においては、ランゲルハンス氏島にも発現する。

【0007】INGAPは、ラットReg蛋白とアミノ酸配列で約40%の相同性を有し、ハムスターを用いたセロファン・ラッピング・モデル(cellophane wrapping model: 脾導管結合モデルに似ているが、炎症細胞浸潤が起こらず、導管細胞の増殖と共に脾臓細胞の新生が起こるモデル)の脾組織から抽出され、脾ランゲルハンス氏島細胞新生誘導作用を有すると考えられている(Rafaeloff, R., et al., J. Clin. Invest., 99, 2100-2109 (1997))。

【0008】B T Cについて、これはマウスインスリノーマ細胞株 $\beta$  T C-3培養液中に見出されたE G F ファミリーに属する増殖因子であり、膜貫通ドメインを有する178個のアミノ酸からなるプロB T Cとして合成され、プロセッシングを受けて成熟型B T Cとして細胞外に分泌されると報告されており(Shing, Y., et al., Science, 259, 1604-1607 (1993))、胎生期臍組織の臍上皮細胞に発現がみられ、臍 $\beta$ 細胞を破壊した糖尿病マウスでは周囲の臍組織で発現が増強することから、臍内分泌細胞の発生や分化機構に関与していると推測されており、B T Cによる臍 $\beta$ 細胞新生促進作用および耐糖能改善効果が報告されている(宮川潤一郎、花房俊昭、医学のあゆみ, Vol.188, No.2, 121-125 (1999))。

【0009】これらの各因子は、上記のように臍 $\beta$ 細胞再生促進作用を有することより、糖尿病治療に利用できることと考えられる。これらの利用によって、非 $\beta$ 細胞からの分化を伴う $\beta$ 細胞新生機構や $\beta$ 細胞特異的増殖促進機構がさらに解明され、それらを促進するような新規な因子が同定されれば、 $\beta$ 細胞の容積を増加させることに基づく新たな糖尿病治療法の開発が可能となり、該新規な遺伝子の同定が当業界で所望されている。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記臍 $\beta$ 細胞増殖活性または血糖降下作用を有し、ヒト、ラットおよびマウスのR e g蛋白とそれぞれ相同意を有する新規な蛋白相同物をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

【0011】上記目的より、本発明者らは、各種ヒト組織由来の遺伝子について検索を重ねた結果、上記目的に合致する新しい臍臍、小腸、大腸、精巣特異的遺伝子の単離、同定に成功し、ここに本発明を完成するに至った。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明によれば、以下の(a)または(b)のポリヌクレオチドを含む遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの相補鎖、(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも95%の相同意を持つポリヌクレオチド。

【0013】また本発明によれば、以下の(a)または(b)のポリペプチドをコードする遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチド、(b) 上記(a)のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ臍 $\beta$ 細胞増殖活性または血糖降下作用を有するポリペプチド。

【0014】また本発明によれば、以下の(a)または

(b) のポリヌクレオチドからなる遺伝子が提供される。

(a) 配列番号：2で示される塩基配列、(b) 上記(a)の塩基配列のポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

#### 【0015】

【発明の実施の形態】本発明に係る上記遺伝子の具体例には、配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に、配列番号：2で示される塩基配列のポリヌクレオチドが包含される。

【0016】更に本発明によれば、以下に示す組換え体発現ベクター、宿主細胞およびポリヌクレオチドが提供される。

(1) 前記遺伝子のいずれかを有する組換え体発現ベクター。

(2) 上記組換え体発現ベクターを有する宿主細胞。

(3) 配列番号：2で示される塩基配列中の少なくとも10の、より好ましくは少なくとも30の連続するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

【0017】更にまた本発明によれば、以下に示す遺伝子治療剤、ポリヌクレオチド・プローブ、ポリペプチド(遺伝子発現産物)、医薬組成物、抗体およびスクリーニング方法が提供される。

(4) 上記ポリヌクレオチドまたはこれを保有するベクターを有効成分とする遺伝子治療剤。

(5) 配列番号：2で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド・プローブ。

(6) 配列番号：2で示される塩基配列中の少なくとも10の、より好ましくは少なくとも30の連続するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド・プローブ。

(7) 以下の(a)または(b)のポリペプチド：

(a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列のポリペプチド、(b) 上記(a)のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり且つ臍 $\beta$ 細胞増殖活性または血糖降下作用を有するポリペプチド。

(8) 本発明遺伝子を発現させてなる遺伝子発現産物。

(9) 上記ポリペプチド(遺伝子発現産物)を有効成分とする医薬組成物、特に臍 $\beta$ 細胞増殖活性剤、血糖降下剤、抗糖尿病剤。

(10) 上記ポリペプチド(遺伝子発現産物)に特異結合性を有する抗体またはその断片。

(11) 本発明遺伝子または遺伝子発現産物を用いる、該遺伝子に対するアゴニスト、アンタゴニストのスクリーニング方法。

(12) 本発明遺伝子または遺伝子発現産物を用いる、該遺伝子のインヒビターのスクリーニング方法。

【0018】上記(5)および(6)に示すプローブは、例えば本発明遺伝子の検出特異的プローブとして有用であ

る。

【0019】本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0020】本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「TSA7005」と名付けられたPCR産物のDNA配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列番号：3に示されるところである。

【0021】該遺伝子は、配列番号：1に示される158アミノ酸配列の新規な肺臓、小腸、大腸、精巣特異的蛋白質(「TSA7005蛋白質」という)をコードする、配列番号：2に示される474塩基配列のオープン・リーディング・フレームを含む、全長1060塩基(配列番号：3に示す)のヒトcDNAである。

【0022】本発明遺伝子TSA7005によりコードされるTSA7005蛋白質は、FASTAプログラム(Person W. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., US A., 85, 2444-2448 (1988))を利用したGenBank/EMBLデータベースの検索の結果、再生肺β細胞においてその発現が認められ、肺β細胞の増殖を促進することが知られているReg蛋白質と相同性を有することが確認された。

【0023】上記Reg蛋白質は、肺β細胞の増殖を促進すること、および該Reg蛋白質とリノマイド(linomide)をNODマウスに投与することにより、糖尿病が改善することが報告されている(Endocrinology, 139(5) 2369-2374 (1998))ことから、本発明遺伝子は再生肺β細胞の増殖因子として機能して糖尿病の進展に抑制的に働くものと考えられる(前記各文献参照)。

【0024】ところで癌の発生には、癌遺伝子の過剰発現が関与していることが知られており、ヒトReg遺伝子は、肺臓、胃粘膜、腎臓で発現しており、さらにヒトReg遺伝子は、大腸癌と直腸癌において異所的に発現が認められることが知られている(J. Biol. Chem., 265 (13) 7432-7439 (1990))ことを考慮すると、本発明に係るTSA7005遺伝子は、それがコードするアミノ酸配列の蛋白質のReg蛋白質との相同性より、TSA7005遺伝子の発現もまた癌組織では変化すると予測される。

【0025】本発明遺伝子は、正常肺臓、小腸、大腸、精巣組織に特異的に発現し、その発現蛋白質の構造上の特徴より、これらの組織の癌組織においては発現が見られない予想されることから、肺臓、小腸、大腸、精巣組織における癌のマーカーとしての有用性が期待できる。

【0026】本発明TSA7005遺伝子の全部または一部を発現させて得られる発現産物は、本発明遺伝子に結合する抗体の製造並びに抗体を用いる診断に利用できる。

【0027】更に本発明遺伝子、特に該遺伝子のセンス鎖断片、これらの発現産物の利用によれば、前記肺β細胞の再生促進作用による糖尿病の進展抑制や癌の進展抑制を行うことができる。

【0028】本発明TSA7005遺伝子の全部または一部は、またこれらをプローブとして利用でき、該利用により肺β細胞の生理的状態の把握が可能となる。従って係るプローブは癌の診断並びに診断用キットの一部として利用することができる。

【0029】本発明TSA7005遺伝子またはその発現産物は更に、TSA7005蛋白質相互作用物のスクリーニングに利用することもできる。

【0030】本発明において遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含する趣旨であり、その長さに何ら制限されるものではない。従って、本発明遺伝子(DNA)には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA(センス鎖)並びに該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(アンチセンス鎖)およびそれらの断片のいずれもが含まれる。

【0031】本発明遺伝子(DNA)は、またリーダ配列、コード領域、エキソン、イントロンを含むことができる。ポリヌクレオチドには、RNAおよびDNAが含まれる。該DNAには、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含まれる。ポリペプチドには、その断片、同族体(ホモログ)、誘導体、変異体が含まれる。上記変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加および挿入によって改変されたアミノ酸配列を有する変異体、同じ機能を有する保存的アミノ酸置換により改変されたアミノ酸配列を有する変異体が含まれる。

【0032】尚、これらアミノ酸配列の改変(変異など)は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、天然由来の遺伝子(例えば本発明の具体例遺伝子)を利用して人為的にこれを行ふこともできる。

【0033】上記変異体は、変異のないポリペプチドと少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものであることができる。

【0034】また、上記ポリペプチドは、変異体、ホモログなどを含めて、いずれも共通に保存する構造的特徴があり、本発明遺伝子発現産物の生物活性、例えば肺β細胞の再生促進活性または抗糖尿病活性を有している。なおポリペプチドの相同性は、配列分析ソフトウェア、

例えばFASTAプログラムを使用した測定(Clustal, V., Methods Mol.Biol., 25, 307-318 (1994))で、或いはSWISS PLOTSで解析することができる。

【0035】上記変異体をコードする遺伝子は、アミノ酸置換についてサイレントまたは保存されている。即ち、塩基配列によってコードされるアミノ酸残基は変わらない。

元のアミノ酸残基	保存的な置換アミノ酸残基
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn または Gln
Ile	Leu または Val
Leu	Ile または Val
Lys	Arg, Aln, または Glu
Met	Leu または Ile
Phe	Met, Leu または Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp または Phe
Val	Ile または Leu

システィン残基(Cys)は、これを他のアミノ酸残基、例えばセリン残基(Ser)、アラニン残基(Ala)、バリン残基(Val)などに置換することが可能である。これによれば、一般に特定ポリペプチドのジスフィド結合に影響を与えることができる。

【0037】所望のポリペプチドの特性に好ましい変化を与えると一般に考えられる置換は、例えば、以下のものである。

- a)親水性残基、例えばSerまたはThrの疎水性残基、例えばLeu、Ile、Phe、ValまたはAlaへの置換、
- b) CysまたはProの、他の各種アミノ酸への置換、
- c)電気的陽性側鎖を有しているアミノ酸残基、例えばLys、Arg、Hisの電気的陰性残基、例えばValまたはAspへの置換、
- d)大きな側鎖を有する残基、例えばPheのGlyのような側鎖を有しないアミノ酸残基への置換。

【0038】以上のとおり、本発明遺伝子TSA7005およびその遺伝子産物の提供は、脾β細胞における該遺伝子の発現の検出による脾β細胞の機能の解明、把握、糖尿病の診断、予防および治療などに極めて有用な情報乃至手段を与える。

【0039】本発明遺伝子は、上記脾β細胞の再生作用によって改善される糖尿病の処置に利用される本発明遺

【0036】保存的な置換アミノ酸残基、即ち、元のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換しても、元のアミノ酸残基を有するポリペプチドの活性が保存されているであろう置換可能なアミノ酸残基は、各アミノ酸残基(元のアミノ酸残基)に対して以下に示されるとおりである。

遺伝子の発現を誘導する新規薬剤の開発(スクリーニング)の面でも好適に利用できる。

【0040】また、本発明遺伝子TSA7005およびその遺伝子産物の提供は、脾臓、小腸、大腸および精巣における各種癌の解明、把握、診断、予防および治療などに極めて有用な情報乃至手段を与える。また、本発明遺伝子は、上記各種癌の処置に利用される本発明遺伝子の発現を誘導する新規薬剤の開発(スクリーニング)の面でも好適に利用できる。

【0041】更に、個体または組織における本発明遺伝子の発現またはその産物の発現の検出や、該遺伝子の変異(欠失や点変異)乃至発現異常の検出は、上記再生脾β細胞に対する機能解析や各種の癌の解明や診断において好適に利用できる。

【0042】本発明遺伝子は、具体的には配列番号:1で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号:2の塩基配列を含む遺伝子、例えば配列番号:3で示される塩基配列を有する遺伝子(TSA7005遺伝子)または配列番号:2で示される塩基配列またはその相補鎖を含むポリヌクレオチドからなる遺伝子として示されるが、特にこれらに限定されない。例えば、本発明遺伝子は、上記特定のアミノ酸配列において一定の変更を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子や、上記特定のアミノ酸配

列と一定の相同性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子や、これら遺伝子の塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列の遺伝子であることができる。上記特定のアミノ酸配列や塩基配列に対して、一定の相同性とは、例えば少なくとも70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは97%以上の相同性を有するものであることができる。本発明はかかる相同性を有する相同物(遺伝子相同物および蛋白相同物)を包含する。

【0043】本発明遺伝子には、また「配列番号：1に示されるアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列(改変されたアミノ酸配列)からなるポリペプチドをコードする遺伝子」も包含される。ここで、「アミノ酸の欠失、置換または付加」の程度およびそれらの位置などは、改変されたアミノ酸配列のポリペプチドが、配列番号：1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(TSA7005蛋白質)と同様の生物学的機能を有する同効物であれば特に制限されない。好ましくは保存的なアミノ酸残基の置換もしくは十数個のアミノ酸配列の改変されたアミノ酸配列、更に好ましくは数個のアミノ酸配列の改変されたアミノ酸配列、からなるポリペプチドをコードする遺伝子が包含される。ここで「同様の機能」とは、脾β細胞増殖活性または血糖降下作用を例示できる。また、上記改変されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子は、その利用によって改変前のアミノ酸配列のポリペプチドをコードする本発明TSA7005遺伝子が検出できるものであってもよい。

【0044】さらに本発明TSA7005遺伝子の相同物(および該遺伝子産物の相同物)とは、本発明TSA7005遺伝子(またはその遺伝子産物)と配列相同性を有し、構造的特徴、遺伝子発現パターンにおける共通性、上記したようなその生物学的機能の類似性などにより、ひとつの遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子(およびその発現産物)を意味する。これには本発明TSA7005遺伝子のアレル体(対立遺伝子)も当然含まれる。

【0045】前記アミノ酸配列の改変(変異)のための人為的手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス[Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)]などの遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段[J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); 同91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); 同24, 245 (1983)]およびそれらの組合せ方法などが例示できる。

【0046】より具体的には、DNAの合成は、ホスホアミダイト法またはトリエステル法による化学合成に

よることもでき、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖と共にアニーリングさせるかまたは適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を附加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

【0047】本発明遺伝子の具体的な構造としては、配列番号：3に示される塩基配列を有する遺伝子を例示できる。この塩基配列中のコーディング領域は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列の各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例を示している。本発明の遺伝子は、かかる特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ、選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる[Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)]。

【0048】また、本発明遺伝子は、前記のとおり、配列番号：2に示される塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含する。

【0049】上記相同性は、配列番号：2に示される塩基配列と少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドを言う。

【0050】かかる相同性遺伝子としては、例えば、0.1% SDSを含む0.2×SSC中50°Cまたは0.1% SDSを含む1×SSC中60°Cのストリッジング条件で配列番号：2に示される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子を例示することもできる。

【0051】本発明遺伝子は、本発明により開示された本発明遺伝子の具体例についての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる[Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法I、II、III」、日本生化学会編 (1986)などを参照]。

【0052】具体的には、本発明遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローニングを選択することにより実施できる[Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)など]。

【0053】上記において、cDNAの起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞などが例示される。また、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。また、cDNAライブラリーは市

販売てもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.)などより市販されている各種cDNAライブラリーなどを用いることもできる。

【0054】本発明の遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

【0055】具体的には、例えばcDNAによって産生される蛋白質に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどやこれらの組合せなどを例示できる。

【0056】ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNAなどが一般的に使用できるが、既に取得された本発明遺伝子やその断片も良好に利用できる。また、本発明遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0057】前記プローブとして用いられるヌクレオチド配列は、配列番号：2に対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも10個の連続した塩基、好ましくは20個の連続した塩基、より好ましくは30個の連続した塩基、最も好ましくは50個の連続した塩基を有するものもできる。また、配列番号：2で示されるオリゴヌクレオチド配列を有する陽性クローンそれ自体をプローブとして用いることもできる。

【0058】本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] によるDNA/RNA增幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法 [Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12 (6), 35 (1994)]、特に5'-RACE法 [M.A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8998 (1988)]などの採用が好適である。

【0059】かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされた本発明の遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などによればよい。

【0060】また、上記で得られる本発明遺伝子或いは各種DNA断片は、常法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)] やマキサムーギルバート法 [Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)]などに従って、また簡便には市販のシーケンスキットなどを用いて、その塩基配列を決定することができる。

【0061】このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の発現の有無を特異的に検出することができる。

【0062】かかる検出は常法に従って行うことができる、例えばRT-PCR [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] によるRNA增幅やノーザンプロットティング解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、in situ RT-PCR [Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)] や in situハイブリダイゼーションなどを利用した細胞レベルでの測定、NASBA法 [Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350, 91-92 (1991)] およびその他の各種方法を挙げることができる。好適には、RT-PCRによる検出法を挙げることができる。

【0063】尚、ここでPCR法を採用する場合に用いられるプライマーとしては、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り、特に制限はなく、本発明遺伝子の配列情報に基いて適宜設定することができる。通常プライマーとして10～35程度のヌクレオチド、好ましくは15～30ヌクレオチド程度の長さを有する本発明遺伝子の部分配列を有するものを挙げることができる。

【0064】このように、本発明の遺伝子には、本発明にかかるTSA7005遺伝子を検出するための特異プライマーおよび/または特異プローブとして使用されるDNA断片もまた包含される。

【0065】当該DNA断片は、配列番号：2に示される塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とするDNAとして規定することができる。ここで、ストリンジエントな条件としては、プライマーまたはプローブとして用いられる通常の条件を挙げることができ、特に制限はされないが、例えば、前述するような0.1% SDSを含む0.2×SSC中50°Cの条件または0.1% SDSを含む1×SSC中60°Cの条件を例示することができる。

【0066】本発明遺伝子はこれを通常の遺伝子工学的手法を用いることにより、該遺伝子の発現産物（ポリペプチド）またはこれを含む蛋白質を容易に大量に、安定して製造することができる。

【0067】従って本発明は、本発明遺伝子のコードするアミノ酸配列のポリペプチド（本発明遺伝子の発現産物）をも提供するものであり、また該ポリペプチドの製造のため、例えば本発明遺伝子を含有するベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培養して本発明ポリペプチドを製造する方法などをも

提供するものである。

【0068】本発明ポリペプチドの具体的態様としては、配列番号：1に示されるアミノ酸配列のポリペプチド(TSA7005蛋白質)を挙げることができるが、本発明ポリペプチドには、該TSA7005蛋白質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記配列番号：1に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つTSA7005蛋白質と同様の機能を有するポリペプチドを挙げることができる。具体的には、前記TSA7005遺伝子の相同物(アレル体を含むTSA7005同等遺伝子)の遺伝子産物を挙げることができる。

【0069】また、本発明TSA7005蛋白質の相同物には、配列番号：1に示されるアミノ酸配列のポリペプチドと同一活性を有する、哺乳動物、例えばウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、マウス、ラット、ウサギなどのげっ歯類動物の蛋白質も包含される。

【0070】本発明のポリペプチドは、本発明により提供されるTSA7005遺伝子の配列情報に基づいて、常法の遺伝子組換え技術〔例えば、*Science*, 224, 1431 (1984) ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 130, 692 (1985) ; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 80, 5990 (1983)など参照〕に従って調製することができる。

【0071】該ポリペプチドの製造は、より詳細には、該所望の蛋白をコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えDNA(発現ベクター)を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することにより行われる。

【0072】上記宿主細胞としては、原核生物および真核生物のいずれも用いることができ、例えば原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌といった一般的に用いられるものが広く挙げられ、好適には大腸菌、とりわけエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12株に含まれるものを例示できる。また、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、酵母などの細胞が含まれ、前者としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞〔*Cell*, 23: 175 (1981)〕やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞およびそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株〔*Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 77: 4216 (1980)〕などが、後者としては、サッカロミセス属酵母細胞などが好適に用いられる。勿論、これらに限定される訳ではない。

【0073】原核生物細胞を宿主とする場合は、該宿主細胞中で複製可能なベクターを用いて、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーターおよびSD(シャイン・アンド・ダルガノ)塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン(例えばATG)を付与した発現プラスミドを好適に利用できる。上記ベクターとしては、一般に大腸菌由来の

プラスミド、例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13などがよく用いられるが、これらに限定されず既知の各種のベクターを利用することができる。大腸菌を利用した発現系に利用される上記ベクターの市販品としては、例えばpGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech社)、pMAL-C2, pMA1-P2 (New England Biolabs社)、pET21, pET21/lacq (Invitrogen社)、pBAD/His (Invitrogen社)などを例示できる。

【0074】脊椎動物細胞を宿主とする場合の発現ベクターとしては、通常、発現しようとする本発明遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終了配列を保有するものが挙げられ、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、具体的には、例えばSV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854 (1981)]などが例示できる。上記以外にも既知の各種の市販ベクターを用いることができる。動物細胞を利用した発現系に利用されるかかるベクターの市販品としては、例えばpEGFP-N, pEGFP-C (Clontech社)、pIND (Invitrogen社)、pCDNA3.1/His (Invitrogen社)などの動物細胞用ベクターや、pFastBacHT (Gibco BRL社)、pAcGHLT (PharMingen社)、pAc5/V5-His, pMT/V5-His, pMT/Bip/V5-his (以上Invitrogen社)などの昆虫細胞用ベクターなどが挙げられる。

【0075】また、酵母細胞を宿主とする場合の発現ベクターの具体例としては、例えば酸性ホスファーゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 1 (1983)]などが例示できる。市販の酵母細胞用発現ベクターには、例えばpPICZ (Invitrogen社)、pPICZ $\alpha$  (Invitrogen社)などが含まれる。

【0076】プロモーターとしても特に限定なく、エッシャエリヒア属菌を宿主とする場合は、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PL/PRプロモーターなどを好ましく利用できる。宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、例えばpH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどを好適に利用できる。また、動物細胞を宿主とする場合の好ましいプロモーターとしては、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを例示でき

る。

【0077】尚、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターも好ましく利用できる。該ベクターの具体例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白として発現させるためのpGEX (Promega社)などを例示できる。

【0078】また、成熟ポリペプチドのコード配列が宿主細胞からのポリペプチドの発現、分泌を助けるポリヌクレオチド配列としては、分泌配列、リーダ配列が例示でき、細菌宿主に対して融合成熟ポリペプチドの精製に使用されるマーカー配列(ヘキサヒスチジン・タグ、ヒスチジン・タグ)、哺乳動物細胞の場合はヘマグルチニン(HA)・タグを例示できる。

【0079】所望の組換えDNA (発現ベクター) の宿主細胞への導入法およびこれによる形質転換法としては、特に限定されず、一般的な各種方法を採用することができる。

【0080】得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により所望のように設計した遺伝子によりコードされる本発明の目的蛋白質が、形質転換体の細胞内、細胞外または細胞膜上に発現、生産(蓄積、分泌)される。

【0081】該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

【0082】かくして得られる本発明の組換え蛋白質は、所望により、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作〔「生化学データーブックII」、1175-1259 頁、第1版第1刷、1980年 6月23日株式会社東京化学同人発行; Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987)など参照〕により分離、精製できる。

【0083】該方法としては、具体的には、通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理(塩析法)、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外済過、分子篩クロマトグラフィー(ゲル済過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せが例示でき、特に好ましい方法としては、本発明蛋白質に対する特異的な抗体を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィーなどを例示することができる。

【0084】尚、本発明ポリペプチドをコードする所望の遺伝子の設計に際しては、配列番号: 2に示されるTSA7005遺伝子の塩基配列を良好に利用することができる。該遺伝子は、所望により、各アミノ酸残基を示すコドンを適宜選択変更して利用することも可能である。

る。

【0085】また、TSA7005遺伝子でコードされるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸残基ないしはアミノ酸配列を置換、欠失、付加などにより改変する場合には、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシスなどの前記した各種方法により行うことができる。

【0086】本発明ポリペプチドは、また、配列番号: 1に示すアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法が含まれる。

【0087】かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていく所謂ステップワイズエロングーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含し、本発明蛋白質の合成は、そのいずれによてもよい。

【0088】上記ペプチド合成に採用される縮合法も、常法に従うことができ、例えば、アシド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA (ジフェニルホスホリルアシド) 法、DCC+添加物 (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシニアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシimidなど) 法、ウッドワード法などを例示できる。

【0089】これら各方法に利用できる溶媒も、この種ペプチド縮合反応に使用されることのよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、酢酸エチルなどおよびこれらの混合溶媒などを挙げることができる。

【0090】尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸乃至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第3級ブチルエステルなどの低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルなどのアラルキルエステルなどとして保護することができる。

【0091】また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばチロシン残基の水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第3級ブチル基などで保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に、例えばアルギニン残基のグアニジノ基は、ニトロ基、トリル基、p-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシ

カルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アマンチルオキシカルボニル基などの適当な保護基により保護することができる。

【0092】上記保護基を有するアミノ酸、ペプチドおよび最終的に得られる本発明蛋白質におけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア／ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸などを用いる方法などに従って実施することができる。

【0093】かくして得られる本発明蛋白質は、前記した各種の方法、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、向流分配法などのペプチド化学の分野で汎用される方法に従って、適宜精製を行うことができる。

【0094】本発明ポリペプチドは、その特異抗体を作成するための免疫抗原としても好適に利用でき、この抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）およびモノクローナル抗体を取得することができる。

【0095】該抗体の製造法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うことができる〔例えば、続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）など参照〕。

【0096】かくして得られる抗体は、例えばTSA7005蛋白の精製およびその免疫学的手法による測定ないしは識別などに有利に利用することができる。より具体的には、本発明遺伝子が相同性を有するReg蛋白が再生脾β細胞において発現が亢進し、脾β細胞の増幅促進が見られることから、該抗体を用いて糖尿病の病態診断、進展度の判定に利用することができる。更に、該抗体はTSA7005蛋白質に結合する抗体またはその断片を有効成分とする糖尿病の病態診断剤として利用できる。

【0097】本発明ポリペプチドは、これを有効成分とする医薬品として医薬分野において有用である。従って、本発明は本発明ポリペプチドを有効成分とする医薬組成物をも提供するものである。

【0098】本発明ポリペプチドの上記医薬組成物の有用性は、前記したように本発明の遺伝子が脾臓、小腸、大腸、精巣の組織において発現しており、特にその発現が脾臓において高く、また本発明遺伝子が相同性を有するReg蛋白が再生脾β細胞において発現が亢進し、脾β細胞の増幅促進が見られることから、これら組織特異的ポリペプチド、即ち、本発明のポリペプチドが有する脾β細胞増殖活性または血糖降下作用にある。

【0099】これらの活性を確認する方法としては、例えば以下の各方法を挙げることができる。（1）ランゲルハンス島の初代培養を行い、リコンビナントTSA7005蛋白質を添加して更に数日間培養を行い、その後、

BrdUを添加して24時間培養し、固定後、抗BrdU抗体と抗インスリン抗体で二重染色を行い、蛍光顕微鏡で抗BrdU抗体と抗インスリン抗体で染色された細胞数を数え、BrdUを取り込んだβ細胞の割合を調べる。（2）NODマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME.）もしくは90%脾切除を行ったラットに0.1～50mg/kgの範囲でリコンビナントTSA7005蛋白質を毎日、腹腔内注射し、10日後に血中グルコース濃度を測定する。

【0100】本発明医薬組成物において有効成分とするポリペプチドまたはその一部には、その医薬的に許容される塩もまた包含される。かかる塩には、当業界で周知の方法により調製される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウムなどの無毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩などが包含される。更に上記塩には、本発明ポリペプチドと適当な有機酸ないし無機酸との反応による無毒性酸付加塩も包含される。代表的無毒性酸付加塩としては、例えば塩酸塩、塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、酢酸塩、磷酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩（トシレート）、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩およびナブシレートなどが例示される。

【0101】上記医薬組成物は、本発明ポリペプチドを有効成分として、その薬学的有効量を、適当な無毒性医薬担体ないし希釈剤と共に含有するものが含まれる。

【0102】上記医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤或は賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。

【0103】特に好ましい本発明医薬製剤は、通常の蛋白製剤などに使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調製される。

【0104】上記安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体などを例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤などと組合せて使用してもよい。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。

【0105】上記L-アミノ酸としては、特に限定はなく例えばグリシン、システィン、グルタミン酸などのいずれでもよい。

【0106】上記糖としても特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの

糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロビルスター、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類などおよびそれらの誘導体などを使用できる。

【0107】上記界面活性剤としても特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用でき、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などを使用できる。

【0108】セルロース誘導体としても特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロビルセルロース、ヒドロキシプロビルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを使用できる。

【0109】上記糖類の添加量は、有効成分1 $\mu$ g当り約0.0001mg程度以上、好ましくは約0.01~10mg程度の範囲とするのが適当である。界面活性剤の添加量は、有効成分1 $\mu$ g当り約0.00001mg程度以上、好ましくは約0.0001~0.01mg程度の範囲とするのが適当である。ヒト血清アルブミンの添加量は、有効成分1 $\mu$ g当り約0.0001mg程度以上、好ましくは約0.001~0.1mg程度の範囲とするのが適当である。アミノ酸は、有効成分1 $\mu$ g当り約0.001~10mg程度とするのが適当である。また、セルロース誘導体の添加量は、有効成分1 $\mu$ g当り約0.00001mg程度以上、好ましくは約0.01~0.1mg程度の範囲とするのが適当である。

【0110】本発明医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.00001~70重量%、好ましくは0.0001~5重量%程度の範囲とするのが適当である。

【0111】また本発明医薬製剤中には、各種添加剤、例えば緩衝剤、等張化剤、キレート剤などをも添加することができる。ここで緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）などを例示できる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンなどを例示できる。またキレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。

【0112】本発明医薬製剤は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時水、生埋的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0113】本発明の医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表

的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態や、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態が含まれ、これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤などに分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

【0114】例えば、錠剤の形態に成形するに際しては、上記製剤担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、リン酸カリウムなどの賦形剤、水、エタノール、プロパンノール、单シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロビルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルビロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロビルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウムなどの崩壊剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリドなどの界面活性剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸などの吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコールなどの滑潤剤などを使用できる。

【0115】更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠とすることができる、また二重錠ないしは多層錠とすることもできる。

【0116】丸剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノールなどの結合剤、ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤などを使用できる。

【0117】カプセル剤は、常法に従い通常本発明の有効成分を上記で例示した各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセルなどに充填して調整される。

【0118】経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釈剤、例えば水を含む医薬的に許容される溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップ、エリキシルなどを包含し、更に潤滑剤、乳剤、懸濁剤などの助剤を含ませることができ、これらは常法に従い調製される。

【0119】非経口投与用の液体投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液などへの調

製に際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルおよびオリーブ油などの植物油などを使用でき、また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチルなどを配合できる。これらには更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤などを添加することもできる。

【0120】滅菌は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させる済過操作、殺菌剤の配合、照射処理および加熱処理などにより実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

【0121】坐剤や腫瘍投与用製剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチンおよび半合成グリセライドなどを使用できる。

【0122】ペースト、クリーム、ゲルなどの軟膏剤の形態に成形するに際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ペントナイトおよびオリーブ油などの植物油などを使用できる。

【0123】経鼻または舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

【0124】尚、本発明薬剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤など他の医薬品などを含有させることもできる。

【0125】上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤は経口投与され、注射剤は単独またはブドウ糖やアミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与され、経腫瘍剤は腫瘍内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与される。

【0126】上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。一般的には、該投与量は、通常、1日当たり体重1kg当たり、約0.01μg～10mg程度、好ましくは約0.1μg～1mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1～数回に分けて投与することができる。

【0127】本発明の医薬製剤の投与は、単独または他の糖尿病に対する治療剤、例えばインスリン、SU剤、

ピクアナイド薬、αグルコシダーゼ阻害薬、インスリン抵抗性改善薬、あるいは食事療法など併用することができる。併用投与は、糖尿病管理において、血糖管理を中心とした他の指標、例えばグリコヘモグロビン、グリコアルブミン、血漿1,5AGなどを糖尿病患者個々の糖尿病の病態によって設定された目標値に到達あるいは近づくように行なうようにするればよい。

【0128】上記の各糖尿病薬との併用により、これら併用される糖尿病併用薬の投与量を減少させることもできるし、これらの併用薬に起因するかもしれない副作用を軽減することもできる。また、併用により早く糖尿病管理目標値に到達することができるかもしれない。

【0129】以下、遺伝子治療につき、詳述する。

【0130】本発明は、本発明TSA7005遺伝子の発現する細胞において、mRNAを作り出し、翻訳を促進し、TSA7005遺伝子の発現量を高めるためのセンス医薬の提供による糖尿病の遺伝子治療法をも提供する。

【0131】該治療法は、例えばTSA7005遺伝子を有する臍β細胞においてmRNAへの転写或いは翻訳の過程を促進することによって、目的とする遺伝子の発現を高める方法である。そのためには遺伝子のmRNAと相補的なセンス・オリゴヌクレオチドを製造し、該センス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に供給する。かかるTSA7005遺伝子の発現機能を促進する作用を標的細胞に供給すれば、受容細胞/標的細胞における新生物の増殖を促進することができる。当該センス・オリゴヌクレオチドの標的細胞への供給は、例えば該オリゴヌクレオチドを含有するベクターまたはプラズミドを、目的細胞の染色体外に導入、維持することにより実施できる。この場合、当該遺伝子は染色体外から細胞により発現される。また、TSA7005遺伝子の発現が認められない臍臍、特に臍β細胞、あるいは小腸、大腸、精巣組織細胞およびそれらの周辺組織細胞に遺伝子を導入して発現させることもでき、この場合、当該遺伝子は細胞の増殖に必要なTSA7005蛋白質の一部分をコードしていくてもよい。

【0132】上記センス・オリゴヌクレオチドを用いた糖尿病遺伝子治療によれば、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV由來のベクターに該センス・オリゴヌクレオチドを組込み、これを臍β細胞に感染させてセンス・オリゴヌクレオチドを発現させることにより、所望の臍β細胞増殖効果または血糖降下作用を得ることができる。

【0133】このようにTSA7005遺伝子を標的とする臍β細胞にセンス・オリゴヌクレオチドを導入してTSA7005遺伝子の発現を促進させる場合、当該センス・オリゴヌクレオチドはTSA7005遺伝子の全長である必要はなく、例えば該TSA7005遺伝子の発現機能を促進する機能と実質的に同質な機能を保持す

る限りにおいて、前記した改変体であっても、また特定の機能を保持した一部配列からなる遺伝子であってよい。

【0134】かかる組換えおよび染色体外維持の双方のための所望遺伝子の導入のためのベクターは、当該分野において既に知られており、本発明ではかかる既知のベクターのいずれもが使用できる。該ベクターとしは、例えば発現制御エレメントに連結したTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドのコピーを含み、かつ目的細胞内で当該センス・オリゴヌクレオチドを発現できる、ウイルスベクターまたはプラスミドベクターを挙げることができる。かかるベクターとしては、通常前述する発現用ベクターそのものを利用することもでき、好適には、例えば起源ベクターとして、米国特許第5252479号明細書およびPCT国際公開WO93/07282号明細書に開示されたベクター(pWP-7A、pWP-19、pWU-1、pWP-8A、pWP-21および/またはpRSV-Lなど)またはpRC/CMV(Invitrogen社製)などを用いて調製されたベクターを利用することができます。より好ましくは、後述する各種ウイルス・ベクターを利用できる。

【0135】なお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに使用されるプロモーターとしては、各種疾患の治療対象となる患部組織に固有のものを好適に利用することができる。

【0136】その具体例としては、例えば、肝臓に対しては、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドラーゼI、カルシノエンブロゲンの抗原などを例示できる。子宮および胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼサイトクロームP450、コレステロール側鎖切断P450、17 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼP450などを例示できる。前立腺に対しては、前立腺抗原、gp91-フォックス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。乳房に対しては、erb-B2、erb-B3、 $\beta$ -カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示できる。肺に対しては、活性剤蛋白質Cウログロブリンなどを例示できる。皮膚に対しては、K-14-ケラチン、ヒトケラチン1または6、ロイクリンなどを例示できる。脳に対しては、神経膠纖維質酸性蛋白質、成熟アストロサイト特異蛋白質、ミエリン、チロシンヒドロキシラーゼ脳膜ヴィリン、グルカゴン、ランゲルハンス島アミロイドポリペプチドなどを例示できる。甲状腺に対しては、チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。骨に対しては、 $\alpha$ 1コラーゲン、オステオカルシン、骨シアログリコプロテインなどを例示できる。腎臓に対してはレニン、肝臓/骨/腎臓アルカリ性ホスフォターゼ、エリスロポエチンなどを、肺臓に対しては、アミラーゼ、PAP1などを例示できる。

【0137】なおセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの製造において、導入されるセンス・オリゴヌクレオチド(TSA7005遺伝子配列全部または一部)は、本発明のTSA7005遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。

【0138】かかるセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入などを始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。なお、TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドで形質転換された細胞は、それ自体単離状態で糖尿病の抑制ないしは糖尿病の病態改善のための医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。

【0139】遺伝子治療においては、上記のセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターは、患者の脾臓組織部位に局所的にまたは全身的に注射投与することにより患者の脾 $\beta$ 細胞内に導入することができる。形質導入された遺伝子が標的脾 $\beta$ 細胞の染色体内に恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的に繰り返すことによって達成できる。

【0140】本発明の遺伝子治療法は、前述するセンス・オリゴヌクレオチド導入用の材料(センス・オリゴヌクレオチド導入用ベクター)を直接体内に投与するインビボ(in vivo)法と、患者の体内より一旦標的とする細胞を取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスピボ(ex vivo)法の両方の方法を包含する。

【0141】またTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドを直接細胞内に導入し、RNA鎖を切断する活性分子であるリボザイムによる遺伝子治療も可能である。

【0142】後述する、本発明TSA7005遺伝子配列のセンス・オリゴヌクレオチド全部もしくはその一部を含有する遺伝子導入用ベクターおよび該ベクターによりヒトTSA7005センス・オリゴヌクレオチド導入された細胞を有効成分とする本発明の遺伝子治療剤は、特に糖尿病をその利用対象とするものであるが、上記の遺伝子治療(処置)は、糖尿病以外にも本発明遺伝子が発現している脾臓、小腸、大腸および精巢組織における癌や遺伝性疾患、AIDSのようなウイルス疾患の治療、並びに遺伝子標識をも目的として行うことができる。

【0143】また、センス・オリゴヌクレオチドを導入する標的細胞は、遺伝子治療(処置)の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、特に脾臓 $\beta$ 細胞、脾 $\beta$ 細胞以外に腫瘍組織細胞、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞、如き細胞などを挙げ

ことができる。

【0144】上記遺伝子治療におけるセンス・オリゴヌクレオチド導入方法には、ウイルス的導入方法および非ウイルス的導入方法が含まれる。

【0145】ウイルス的導入方法としては、例えば、TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドが正常細胞に発現する外来の物質であることに鑑みて、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる方法を挙げることができる。その他のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、HIV (*human immunodeficiency virus*) ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV, *adeno-associated virus*) 、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターおよびエプスタイン-バーウイルス (EBV, *Epstein-Barr virus*) ベクターなどがあげられる。

【0146】非ウイルス的な遺伝子導入方法としては、リン酸カルシウム共沈法；DNAを封入したリポソームと予め紫外線で遺伝子を破壊した不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームを作成し、細胞膜と直接融合させてDNAを細胞内に導入する膜融合リポソーム法 [Kato, K., et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 22071-22074 (1991)] ; プラスミドDNAを金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にDNAを導入する方法 [Yang, N.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9568-9572 (1990)] ; プラスミドDNAを直接インビボで臓器や腫瘍に注入するネイキッド (naked) DNA法 [Wolff, J.A., et al., *Science*, 247, 1465-1467 (1990)] ; 多重膜正電荷リポソームに包埋した遺伝子を細胞に導入するカチオニック・リポソーム法 [八木国夫, 医学のあゆみ, Vol. 175, No. 9, 635-637 (1995)] ; 特定細胞のみに遺伝子を導入し、他の細胞に入らないようにするため、目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをDNAと結合させてそれを投与するリガンド-DNA複合体法 [Frindeis, et al., *Trends Biotechnol.*, 11, 202 (1993); Miller, et al., *FASEB J.*, 9, 190 (1995)] などを使用することができる。

【0147】上記リガンド-DNA複合体法には、例えば肝細胞が発現するアシアロ糖蛋白レセプターをターゲットとしてアシアロ糖蛋白をリガンドとして用いる方法 [Wu, et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 14338 (1991); Ferkol, et al., *FASEB J.*, 7, 1081-1091 (1993)] や、腫瘍細胞が強く発現しているトランスフェリン・レセプターを標的としてトランスフェリンをリガンドとして用いる方法 [Wagner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 3410 (1990)] などが含まれる。

【0148】また本発明で用いられる遺伝子導入法は、上記の如き各種の生物学的および物理学的な遺伝子導入法を適宜組合せたものであってもよい。該組合せによる方法としては、例えばあるサイズのプラスミドDNAをアデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン

抱合抗体と組合わせる方法を例示できる。該方法によれば、得られる複合体がアデノウイルスベクターに結合し、かくして得られる三分子複合体を細胞に感染させることにより本発明センス・オリゴヌクレオチドの導入を行いうける。この方法では、アデノアイルスベクターにカップリングしたDNAが損傷される前に、効率的な結合、内在化およびエンドソーム分解が可能となる。また、前記リポソーム/DNA複合体は、直接インビボにて遺伝子導入を媒介できる。

【0149】以下、具体的な本発明のセンス・オリゴヌクレオチド導入用ウイルスベクターの作成法並びに標的細胞または標的組織へのセンス・オリゴヌクレオチド導入法について述べる。

【0150】レトロウイルスベクター・システムは、ウイルスベクターとヘルパー細胞 (パッケージング細胞) からなっている。ここでヘルパー細胞は、レトロウイルスの構造蛋白質 gag (ウイルス粒子内の構造蛋白質) 、pol (逆転写酵素) 、env (外被蛋白質) などの遺伝子を予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングナルやLTR (long terminal repeat) を有しているが、ウイルス複製に必要な gag 、pol 、envなどの構造遺伝子を持っていない。パッケージングナルはウイルス粒子のアセンブリーの際にタグとなる配列で、選択遺伝子 (neo, hyg) とクローニングサイトに組込まれた所望の導入センス・オリゴヌクレオチド (TSA7005の全配列センス・オリゴヌクレオチドまたはその断片) がウイルス遺伝子の代りに挿入される。ここで高力価のウイルス粒子を得るにはインサートを可能な限り短くし、パッケージングナルを gag 遺伝子の一部を含め広くとることと、 gag 遺伝子のATGを残さぬように行ることが重要である。

【0151】所望のTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド組み込んだベクターDNAをヘルパー細胞に移入することによって、ヘルパー細胞が作っているウイルス構造蛋白質によりベクターゲノムRNAがパッケージされてウイルス粒子が形成され、分泌される。組換えウイルスとしてのウイルス粒子は、標的細胞に感染した後、ウイルスゲノムRNAから逆転写されたDNAが細胞核に組み込まれ、ベクター内に挿入されたセンス遺伝子、即ちTSA7005遺伝子が発現する。

【0152】尚、所望の遺伝子の導入効率を上げる方法として、フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合部位と接合セグメントとを含む断片を用いる方法 [Hanenberg, H., et al., *Exp. Hemat.*, 23, 747 (1995)] を採用することもできる。

【0153】なお、上記レトロウイルスベクター・システムにおいて用いられるベクターとしては、例えばマウスの白血病ウイルスを起源とするレトロウイルス [McLaughlin, J.R., et al., *Proc. Natl. Acad. Res. Molec.*

Biol., 38, 91-135 (1990)】を例示することができる。

【0154】アデノウイルスベクターを利用する方法につき詳述すれば、該アデノウイルスベクターの作成は、バークネル〔Berkner, K.L., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)〕、瀬戸口康弘ら〔Setoguchi, Y., et al., Blood, 84, 2946-2953 (1994)〕、鐘力江裕美ら〔実験医学, 12, 28-34 (1994)〕およびケナーら〔Ketner, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 86-6190 (1994)〕の方法に準じて行うことができる。

【0155】例えば、非増殖性アデノウイルスベクターを作成するには、まずアデノウイルスの初期遺伝子のE1および／またはE3遺伝子領域を除去する。次に、目的とする所望の外来遺伝子発現単位（目的とする導入センス・オリゴヌクレオチド、即ち本発明TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドそのセンス・オリゴヌクレオチドを転写するためのプロモーター、転写された遺伝子の安定性を賦与するポリAから構成）およびアデノウイルスゲノムDNAの一部を含むプラスミドベクターと、アデノウイルスゲノムを含むプラスミドとを、例えば293細胞に同時にトランスフェクションする。この2者間で相同性組換えを起こさせて、遺伝子発現単位とE1とを置換することにより、所望のTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドを包含する本発明ベクターである非増殖性アデノウイルスベクターを作成することができる。また、コスミドベクターにアデノウイルスゲノムDNAを組み込んで、末端蛋白質を付加した3'側アデノウイルスベクターを作成することもできる。更に組換えアデノウイルスベクターの作成には、YACベクターも利用可能である。

【0156】アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの製造につき概略すると、AAVはアデノウイルスの培養系に混入してくる小型のウイルスとして発見された。これには、ウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属と、ヘルパーウイルスを必要とするディペンドウイルス属の存在が確認されている。該AAVは宿主域が広く、種々の細胞に感染するありふれたウイルスであり、ウイルスゲノムは大きさが4680塩基の線状一本鎖DNAからなり、その両端の145塩基がITR（inverted terminal repeat）と呼ばれる特徴的な配列を持って存在している。このITRの部分が複製開始点となり、プライマーの役割をなす。更にウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにも、該ITRが必須となる。また、ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、即ち複製や転写をつかさどる調節蛋白質のRepをコードしている。

【0157】組換えAAVの作成は、AAVが染色体DNAに組み込まれる性質を利用して行うことができ、かくして所望の遺伝子導入用ベクターが作成できる。この

方法は、より詳しくは、まず野生型AAVの5'端と3'端の両端のITRを残し、その間に所望の導入用アンチセンス・オリゴヌクレオチド（TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド）を挿入したプラスミド（AAVベクタープラスミド）を作成する。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は、別のヘルパープラスミドにより供給させる。この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにし、遺伝子組換えによる野生型ウイルスが出現しないようにする必要がある。その後、両者のプラスミドを例えば293細胞へのトランスフェクションにより導入し、さらにヘルパーウイルスとしてアデノウイルス（293細胞を用いる場合は非増殖型のものでもよい）を感染させると、非増殖性の所望の組換えAAVが産生される。続いて、この組換えAAVは核内に存在するので、細胞を凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスを56°C加熱により失活させる。更に必要に応じて塩化セシウムを用いる超遠心法により組換えAAVを分離濃縮する。上記のようにして所望の遺伝子導入用の組換えAAVを得ることができる。

【0158】EBVベクターの製造は、例えば清水らの方法に準じて行うことができる〔清水則夫、細胞工学, 14(3), 280-287 (1995)〕。

【0159】本発明の係わるセンス・オリゴヌクレオチド導入用EBVベクターの製造につき概略すると、EBVウイルス（Epstein-Barr virus: EBV）は、1964年にエプスタイン（Epstein）らによりバーキット（Burkitt）リンパ腫由来の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルスである〔Kieff, E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp.1889-1920〕。該EBVには細胞をトランスフォームする活性があるので、遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフォーム活性を欠いたウイルスを調製しなければならない。これは次の如くして実施できる。

【0160】即ち、まず、所望の外来遺伝子を組み込む標的DNA近傍のEBVゲノムをクローニングする。そこに外来遺伝子のDNA断片と薬剤耐性遺伝子を組込み、組換えウイルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素により切り出された組換えウイルス作製用ベクターをEBV陽性Akata細胞にトランスフェクトする。相同組換えにより生じた組換えウイルスは抗表面免疫グロブリン処理によるウイルス産生刺激により野生型AkataEBVとともに回収できる。これをEBV陰性Akata細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型EBVが共存しない所望の組換えウイルスのみが感染したAkata細胞を得ることができる。さらに組換えウイルス感染Akata細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

【0161】組換えウイルスベクターを用いることなく所望のセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入する、非ウイルスベクターの製造は、例えば膜融合リポソームによる遺伝子導入法により実施することができる。これは膜リポソーム（脂質二重膜からなる小胞）に細胞膜への融合活性をもたせることにより、リポソームの内容物を直接細胞内に導入する方法である。

【0162】上記膜融合リポソームによるセンス・オリゴヌクレオチドの導入は、例えば中西らの方法によって行うことができる〔Nakanishi, M., et al., *Exp. Cell Res.*, 159, 399-499 (1985); Nakanishi, M., et al., *Gene introduction into animal tissues. In Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery* (ed. by Lee, V.H. et al.), Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, 1995, pp.337-349〕。

【0163】以下、該膜融合リポソームによるセンス・オリゴヌクレオチドの導入法につき概略する。即ち、紫外線で遺伝子を不活性化したセンダイウイルスと所望のセンス・オリゴヌクレオチドや発現蛋白質などの高分子物質を封入したリポソームを37°Cで融合させる。この膜融合リポソームは、内側にリポソーム由来の空洞を、外側にウイルス・エンベロープと同じスパイクがある疑似ウイルスともよばれる構造を有している。更にショ糖密度勾配遠心法で精製後、標的とする培養細胞または組織細胞に対して膜融合リポソームを4°Cで吸着させる。次いで37°Cにするとリポソームの内容物が細胞に導入され、所望のセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入できる。ここでリポソームとして用いられる脂質としては、50%（モル比）コレステロールとレシチンおよび陰電荷をもつ合成リン脂質で、直径300nmの1枚膜リポソームを作製して使用するのが好ましい。

【0164】また、別のリポソームを用いてセンス・オリゴヌクレオチドを標的細胞に導入する方法としては、カチオニック・リポソームによるセンス・オリゴヌクレオチド導入法を挙げることができる。該方法は、八木らの方法に準じて実施できる〔Yagi, K., et al., *B.B.R.* C., 196, 1042-1048 (1993)〕。この方法は、プラスミドも細胞も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとするものである。ここで用いられるリポソームは正荷電を有する多重膜の大きなリポソーム（multilamellar large vesicles: MLV）が有用であるが、大きな1枚膜リポソーム（large unilamellar vesicles: LUV）や小さな1枚膜リポソーム（small unilamellar vesicles: SUV）を使用してプラスミドとの複合体を作製し、所望のセンス・オリゴヌクレオチドを導入することも可能である。

【0165】プラスミド包埋カチオニックMLVの調製法について概略すると、これはまず脂質TMAG（N-

( $\alpha$ -trimethylammonioacetyl)-diododecyl-D-glutamate chloride）、DLPC（dilauroyl phosphatidylcholine）およびDOPC（dioleoylphosphatidylethanolamine）をモル比が1:2:2となる割合で含むクロロホルム溶液（脂質濃度として1mM）を調製する。次いで総量1μmolの脂質をスピッツ型試験管に入れ、ロータリーエバボレーターでクロロホルムを減圧除去して脂質薄膜を調製する。更に減圧下にクロロホルムを完全に除去し、乾燥させる。次いで20μgの遺伝子導入用プラスミドを含む0.5mlのダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液-Mg, Ca含有を添加し、窒素ガス置換後、2分間ポルテックスミキサーにより攪拌して、所望のセンス・オリゴヌクレオチドを含有するプラスミド包埋カチオニックMLV懸濁液を得ることができる。

【0166】上記で得られたプラスミド包埋カチオニックMLVを遺伝子治療剤として使用する一例としては、例えば発現目的センス・オリゴヌクレオチドを組み込んだ発現プラスミドを上記カチオニックMLVにDNA量として0.6μg、リポソーム脂質量として30ナノモルになるように包埋し、これを2μlのリン酸緩衝生理食塩液に懸濁させて患者より抽出した標的細胞または患者組織に対して隔日投与する方法が例示できる。

【0167】ところで、遺伝子治療とは「疾病の治療を目的として、遺伝子または遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与すること」と厚生省ガイドラインに定義されている。しかしながら、本発明における遺伝子治療とは、該ガイドラインの定義に加えて、前記した標的細胞にTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチドの隣β細胞増殖センスDNAとして特徴付けられるセンス・オリゴヌクレオチドを導入することによって糖尿病疾患の治療のみならず、更に標識となる遺伝子または標識となる遺伝子を導入した細胞をヒト体内に導入することも含むものとする。

【0168】本発明の遺伝子治療において、所望遺伝子の標的細胞または標的組織への導入方法には、代表的には2種類の方法が含まれる。

【0169】その第1法は、治療対象とする患者から標的細胞を採取した後、該細胞を体外で例えばインターロイキン-2(IL-2)などを添加して培養し、レトロウイルスベクターに含まれる目的とするTSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド導入した後、得られる細胞を再移植する手法(ex vivo法)である。該方法はADA欠損症を始め、欠陥遺伝子によって発生する遺伝子病や癌、AIDSなどの治療に好適とされている。

【0170】第2法は、目的センス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)を直接患者の体内や腫瘍組織などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法(直接法)である。

【0171】上記遺伝子治療の第1法は、より詳しくは、例えば次のようにして実施される。即ち、患者から

採取した単核細胞を血液分離装置を用いて単球から分取し、分取細胞をIL-2の存在下にAIM-V培地などの適当な培地で72時間程度培養し、導入すべきアンチセンス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)を含有するベクターを加える。センス・オリゴヌクレオチドの導入効率をあげるために、プロタミン存在下に32°Cで1時間、2500回転にて遠心分離した後、37°Cで10%炭酸ガス条件下で24時間培養してもよい。この操作を数回繰り返した後、更にIL-2存在下にAIM-V培地などで48時間培養し、細胞を生理食塩水で洗浄し、生細胞数を算定し、センス・オリゴヌクレオチド導入効率を前記in situ PCRや、例えば所望の対象が酵素活性であればその活性の程度を測定することにより、目的センス・オリゴヌクレオチド導入効果を確認する。

【0172】また、培養細胞中の細菌・真菌培養、マイコプラズマの感染の有無、エンドトキシンの検索などの安全度のチェックを行い、安全性を確認した後、予測される効果用量のセンス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)が導入された培養細胞を患者に点滴静注により戻す。かかる方法を例えれば数週間から数ヵ月間隔で繰り返すことにより遺伝子治療が施される。

【0173】ここでウイルスベクターの投与量は、導入する標的細胞により適宜選択される。通常、ウイルス価として、例えば標的細胞 $1 \times 10^8$ 細胞に対して $1 \times 10^3$ c.f.uから $1 \times 10^8$ c.f.uの範囲となる投与量を採用することが好ましい。

【0174】上記第1法の別法として、目的センス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)を含有するレトロウイルスベクターを含有するウイルス産生細胞と例えば患者の細胞とを共培養して、目的とする細胞へセンス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)を導入する方法を採用することもできる。

【0175】遺伝子治療の第2法(直接法)の実施に当たっては、特に体外における予備実験によって、遺伝子導入法によって、実際に目的センス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)が導入されるか否かを、予めベクター遺伝子cDNAのPCR法による検索やin situ PCR法によって確認するか、或いは目的センス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)の導入に基づく所望の治療効果である特異的活性の上昇や標的細胞の増殖増加や増殖抑制などを確認することが望ましい。また、ウイルスベクターを用いる場合は、増殖性レトロウイルスなどの検索をPCR法で行うか、逆転写酵素活性を測定するか、或は膜蛋白(env)遺伝子をPCR法でモニターするなどにより、遺伝子治療に際してセンス・オリゴヌクレオチド導入による安全性を確認することが重

要であることはいうまでもない。

【0176】本発明遺伝子治療法において、特に糖尿病を対象とする場合は、患者から脾β細胞を採取後、酵素処理などを施して培養細胞を樹立した後、例えばレトロウイルスにて所望のセンス・オリゴヌクレオチドを標的とする脾β細胞に導入し、G418細胞にてスクリーニングした後、IL-12などの発現量を測定(in vivo)し、次いで放射線処理を施行し、患者脾β細胞内または傍脾β細胞にセンス・オリゴヌクレオチド導入細胞を接種する糖尿病治療法を一例として挙げることができる。

【0177】本発明はまた、本発明のセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターまたは目的センス・オリゴヌクレオチド(TSA7005のセンス・オリゴヌクレオチド)が導入された細胞を活性成分とし、それを薬学的有効量、適当な無毒性医薬担体ないしは希釈剤と共に含有する医薬組成物または医薬製剤(遺伝子治療剤)を提供する。

【0178】本発明の医薬組成物(医薬製剤)に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤ないし賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

【0179】本発明医薬製剤の投与単位形態としては、前記したTSA7005ポリペプチド製剤の製剤例を同様に挙げることができ、治療目的に応じて各種の形態から適宜選択することができる。

【0180】例えば、本発明のセンス・オリゴヌクレオチド導入用ベクターを含む医薬製剤は、該ベクターをリボソームに包埋された形態あるいは所望のセンス・オリゴヌクレオチドが含まれるレトロウイルスベクターを含むウイルスによって感染された培養細胞の形態に調製される。

【0181】これらは、リン酸緩衝生理食塩液(pH 7.4)、リングル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態などに調製することもでき、またプロタミンなどの遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調製することもできる。

【0182】上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。

【0183】上記医薬製剤中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。

【0184】一般には、医薬製剤としての所望センス・オリゴヌクレオチド含有レトロウイルスベクターの投与量は、1日当り体重1kg当り、例えばレトロウイルスの力値として約 $1 \times 10^3$ c.f.uから $1 \times 10^{15}$ c.f.u程度とするのがよい。

【0185】また所望の導入用センス・オリゴヌクレオチドが導入された細胞の場合は、 $1 \times 10^4$ 細胞/bodyから $1 \times 10^{15}$ 細胞/body程度の範囲から選ばれるのが適当である。

【0186】該製剤は1日に1回または数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導入効率を高める物質またはこれを含む製剤と併用投与することができる。

【0187】本発明に従う遺伝子治療を糖尿病の治療に適用する場合は、前記した種々の遺伝子治療を適宜組合させて行う（結合遺伝子治療）こともでき、前記した遺伝子治療に、従来の糖尿病治療法、食事療法などを組合させて行うこともできる。さらに本発明遺伝子治療は、その安全性を含めて、N I-H のガイドラインを参考にして実施することができる〔Recombinant DNA Advisory Committee, Human GeneTherapy, 4, 365-389 (1993)〕。

【0188】本発明によれば、肺臓、小腸、大腸、精巣、特に肺 $\beta$ 細胞中に発現しているTSA7005遺伝子の存在を検出するために、これら組織における生物学的試料を調製し、所望により核酸を抽出し、TSA7005遺伝子が存在する否かについて分析することが可能である。また、本発明によれば細胞または組織における肺 $\beta$ 細胞活性化の程度、糖尿病の病態、または糖尿病の予後指標としての存在を検出するためには、組織細胞、リンパ節などの生物学的な試料を調製し、TSA7005遺伝子が存在するか否かについて分析できる。この方法を用いることにより細胞または組織における肺 $\beta$ 細胞活性化の程度、糖尿病の病態、または糖尿病の予後指標としての存在を検出することが可能となり、これらの診断、例えば肺 $\beta$ 細胞活性化の程度の診断、肺 $\beta$ 細胞機能低下の発見、糖尿病治療効果の判定、予後の予測が可能となる。

【0189】該検出方法は、例えば、予め糖尿病を有する患者サンプルから得られたTSA7005遺伝子に関する情報を基に、該DNA断片を作成し、TSA7005遺伝子のスクリーニングおよび/またはその増幅に用いられるように設計される。より具体的には、例えばブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ザザンプロット法、ノーザンプロット法などにおけるプローブとしての性質を有するもの、核酸配列をポリメラーゼで増幅するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、増幅したTSA7005の全部または一部のDNA断片を得ることができるためのプローブとしての性質を有するものを作成できる。そのためにはまずTSA7005と同じ配列を持つプライマーを作成し、スクリーニング用プローブとして用い、生物学的試料（核酸試料）と反応させることにより、当該TSA7005配列を有する遺伝子の存在を確認することができる。該核酸試料は、標的配列の検出を容易にする種々の

方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッティングで調製してもよい。

【0190】前記スクリーニング方法としては、特にPCR法を用いるのが感度の点から好ましく、該方法は、TSA7005断片をプライマーとして用いる方法であればとくに制限されず、従来公知の方法(Science, 230, 1350-1354 (1985) や新たに開発された、或いは将来使用されるPCR変法(柳佳之、ほか編、羊土社、実験医学、増刊、8(9), (1990); 蛋白質・核酸・酵素、臨時増刊、共立出版(株), 35(17), (1990))のいずれも利用することが可能である。

【0191】プライマーとして使用されるDNA断片は、化学合成したオリゴDNAであり、これらオリゴDNAの合成は自動DNA合成装置など、例えばDNA合成装置(PharmaciaLKB Gene Assembler Plus: ファルマシア社製)を使用して合成することができる。合成されるプライマー(センスプライマーまたはアンチセンスプライマー)の長さは約10~30ヌクレオチド程度が好ましく例示できる。上記スクリーニングに用いられるプローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよく、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合によって検出してもよい。適当な標識、並びにプローブおよびリガンドを標識する方法は、本発明の技術分野で知られており、ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングムまたはキナーゼ処理のような、既知の方法によって取り込ませることができる放射性標識、ビオチン、蛍光性基、化学発光基、酵素、抗体などがこれらの技術に包含される。

【0192】検出のために用いるPCR法としては、例えばRT-PCR法が例示されるが、当該分野で用いられる種々の変法を適応することができる。

【0193】また、本発明の測定方法は、試料中のTSA7005遺伝子の検出のための試薬キットを利用することによって、簡便に実施することができる。

【0194】故に本発明は上記TSA7005DNA断片を含有することを特徴とするTSA7005の検出用試薬キットが提供される。

【0195】該試薬キットは、少なくとも配列番号: 2に示される塩基配列もしくはその相補的塩基配列の一部または全てにハイブリダイズするDNA断片を必須構成成分として含んでいれば、他の成分として、標識剤、PCR法に必須な試薬（例えば、TaqDNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、プライマーなど）が含まれていてもよい。

【0196】標識剤としては、放射性同位元素または蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられるが、DNA断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてよい。更に当該試薬キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

【0197】更に本発明は、前記測定方法を用いる糖尿病の診断方法および該方法に用いる診断剤並びに診断用キットをも提供するものである。

【0198】また、前記方法を用いることにより、被検試料中から得られたTSA7005遺伝子の配列を直接的若しくは間接的に配列決定することにより、TSA7005遺伝子の野生型と相同性の高い相同物である新たなTSA7005遺伝子に関連する関連遺伝子を見出すことができる。

【0199】従って、本発明はかかる測定と被検試料中のTSA7005遺伝子の配列決定により、被検試料中のヒトTSA7005遺伝子に関連する関連遺伝子のスクリーニング方法をも提供するものである。

【0200】また、本発明ヒトTSA7005遺伝子によりコードされる蛋白質(配列番号:1で示されるアミノ酸配列のポリペプチド)または該配列番号:1において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列のポリペプチド或いはこれらの断片を利用し、またこれら各蛋白質に対する抗体を利用すれば、野生型TSA7005および/または変異TSA7005の測定が可能となる。

【0201】従って、本発明は、野生型TSA7005および/または変異TSA7005の抗体測定法、抗原測定法を提供するものである。該測定法によって糖尿病状態の障害の程度あるいは糖尿病の悪性度を野生型TSA7005ポリペプチドの変化に基づいて検出することも可能である。かかる変化は、この分野における前記慣用技術によるTSA7005配列分析によっても決定でき、更に好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル抗体)を用いて、TSA7005ポリペプチド中の相違、またはTSA7005蛋白質の有無を検出することができる。本発明の測定法の具体的な例示としては、TSA7005抗体は、血液・血清、リンパ球などのヒトより採取した生体材料試料含有溶液からTSA7005ポリペプチドを免疫沈降し、かつポリアクリルアミドゲルのウェスタン・プロットまたはイムノプロット上でTSA7005ポリペプチドと反応することができる。また、TSA7005抗体は免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中のTSA7005ポリペプチドを検出することができる。抗体産生技術および精製する技術は該分野においてよく知られているので、これらの技術を適宜選択することができる。

【0202】野生型TSA7005またはその突然変異体を検出する方法に関連するより好ましい具体例には、モノクローナル抗体および/または、ポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)、免疫放射線検定法(IRM)および免疫酵素法(EMA)が含まれる。

【0203】また、本発明は、TSA7005ポリペプ

チドに対するTSA7005結合活性を有する細胞膜画分または細胞表面上に存在するTSA7005レセプターをも提供することが可能である。該TSA7005レセプターの取得は、細胞膜画分を含む生体材料試料中ににおいて標識したTSA7005ポリペプチドをコンジュゲートさせ、TSA7005結合反応物を抽出・単離、精製し、単離物のアミノ酸配列を特定することによって達成され、該TSA7005レセプター蛋白の取得並びに配列決定は、この分野の当業者にとり自明である。

【0204】また本発明は、TSA7005レセプター結合反応物またはその結合断片を種々の薬剤のいずれかをスクリーニングする技術に用いることによって、化合物(TSA7005レセプター反応物:化合物は低分子化合物、高分子化合物、蛋白質、蛋白質部分断片、抗原、抗体など言う)をスクリーニングすることに利用可能である。好ましくは、TSA7005レセプターを利用する。かかるスクリーニング試験に用いるTSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片は、固体支持体に付着するかまたは細胞表面に運ばれている溶液中の遊離物であってもよい。

【0205】薬剤スクリーニングの一例としては、例えば、TSA7005ポリペプチドまたはその断片を発現する組換え蛋白質で安定して形質転換した原核生物または真核生物の宿主細胞を、好ましくは競合的結合アッセイにおいて利用することができる。また遊離のまたは固定した形態のかかる細胞を標準結合アッセイに用いることもできる。より具体的には、TSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片と、試験する物質との間の複合体の形成を測定し、TSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片とTSA7005ポリペプチドまたはその断片との間の複合体の形成が試験する物質によって阻害される程度を検出することによって化合物をスクリーニングすることができる。

【0206】かくして、本発明は、当該分野で既知の方法によって、かかる物質とTSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片とを接触させ、次いで、該物質とTSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片との間の複合体の存在、またはTSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片とリガンドとの間の複合体の存在について測定する、薬剤のスクリーニング方法を提供することができる。さらに、TSA7005レセプター活性を測定して、かかる物質がTSA7005レセプターを阻害でき、かくして上記定義されたTSA7005の活性、例えば細胞の成長を調節できるかどうか、或いは蛋白-蛋白相互結合の調節または複合体形成能の調節ができるかどうか判断する。かかる競合結合アッセイにおいて、より具体的には、TSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片を標識する。遊離のTSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片を、蛋白質:蛋白質複合体で存在するものから分離

し、遊離(複合体未形成)標識の量は、各々、試験される因子のTSA7005レセプターに対する結合またはTSA7005レセプター:TSA7005ポリペプチド結合の阻害の尺度となる。TSA7005ポリペプチドの小さなペプチド(ペプチド疑似体)をこのように分析し、TSA7005レセプター阻害活性を有するものを測定できる。

【0207】本発明において、薬剤スクリーニングのための他の方法は、TSA7005レセプターポリペプチドに対して適当な結合親和性を有する化合物についてのスクリーニング法であって、該略すると、多数の異なるペプチド試験化合物をプラスチックのピンまたは他の物質の表面のごとき固体支持体上で合成し、次いでペプチド試験化合物をTSA7005レセプターポリペプチドと反応させ、洗浄する。次いで既知の方法を用いて反応結合TSA7005レセプターポリペプチドを検出する方法も例示できる(PCT特許公開番号:WO84-03564号)。精製されたTSA7005レセプターは、直接、前記の薬剤スクリーニング技術で使用するプレート上に被覆することができる。ポリペプチドに対する非-中和抗体を用いて抗体を補足し、TSA7005レセプターポリペプチドを固相上に固定することができる。

【0208】さらに本発明は、競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも目的とする。これによれば、TSA7005レセプターポリペプチドまたはその断片に対する結合性につき、TSA7005レセプターポリペプチドに特異的に結合できる中和抗体と試験化合物とを競合させる。抗体による該競合によって、TSA7005レセプターポリペプチドの1またはそれ以上の抗原決定部位を有するいずれのペプチドの存在をも検出することができる。

【0209】また、薬剤スクリーニングに関し、更なる方法としては、非機能性TSA7005遺伝子を含有する宿主真核細胞系または細胞の使用が挙げられる。宿主細胞系または細胞を薬剤化合物の存在下において一定期間増殖させた後、該宿主細胞の増殖速度を測定して、該化合物が例え、細胞の成長を調節できるかどうか、或いは蛋白-蛋白相互結合の調節または複合体形成能の調節できるかどうかを確認する。増殖速度を測定する1手段として、TSA7005レセプターの生物活性を測定することも可能である。

【0210】また本発明によれば、より活性または安定した形態のTSA7005ポリペプチド誘導体または例えば、イン・ビボ(*in vivo*)でTSA7005ポリペプチドの機能を高めるかもしくは妨害する薬剤を開発するために、それらが相互作用する目的の生物学的に活性なポリペプチドまたは構造アナログ、例えばTSA7005アゴニスト、TSA7005アンタゴニスト、TSA7005インヒビターなどを作製することが可能であ

る。前記構造アナログは例えばTSA7005と他の蛋白質の複合体の三次元構造をX線結晶学、コンピューター・モデリングまたは、これらの組み合わせた方法によって決定することができる。また、構造アナログの構造に関する情報は、相同性蛋白質の構造に基づくポリペプチドのモデリングによって得ることも可能である。

【0211】また上記より活性または安定した形態のTSA7005ポリペプチド誘導体を得る方法としては、例えばアラニン・スキャンによって分析することが可能である。該方法はアミノ酸残基をAlaで置換し、ペプチドの活性に対するその影響を測定する方法でペプチドの各アミノ酸残基をこのように分析し、当該ペプチドの活性や安定性に重要な領域を決定する方法である。該方法によって、より活性な、または安定なTSA7005誘導体を設計することができる。

【0212】また機能性アッセイによって選択した標的一特異的抗体を単離し、次いでその結晶構造を解析することも可能である。原則として、このアプローチにより、続く薬剤の設計の基本となるファーマコア(pharmacore)を得る。機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体を生成させることによって、化学的または生物学的に生成したペプチドのバンクよりペプチドを同定したり単離したりすることができる。故に選択されたペプチドもファーマコアとして作用すると予測される。

【0213】かくして、改善されたTSA7005活性もしくは安定性またはTSA7005活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発することができる。また本発明によれば、TSA7005遺伝子含有ノックアウト・マウス(変異マウス)を作成することによってTSA7005遺伝子配列のどの部位が生体内で上記したような細胞または組織の変化に影響を与えるかどうか、即ちTSA7005遺伝子産物、並びに変異TSA7005遺伝子産物が生体内でどのような機能を有するかを確認することができる。

【0214】該方法は、遺伝子の相同組換えを利用して、生物の遺伝情報を意図的に修飾する技術であり、マウスの胚性幹細胞(E S細胞)を用いた方法を例示できる(Capecchi, M. R., *Science*, 244, 1288-1292 (1989))。

【0215】尚、上記変異マウスの作製方法はこの分野の当業者にとって既に通常の技術であり、この変更技術(野田哲生編、実験医学、増刊、14(20) (1996)、羊土社)に、本発明のヒト野生型TSA7005遺伝子および変異TSA7005遺伝子を適応して容易に変異マウスを作製し得る。従って前記技術の適応により、改善されたTSA7005活性もしくは安定性またはTSA7005活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとしての作用を有する薬剤を設計・開発すること

ができる。

【0216】

【発明の効果】本発明によれば、脾β細胞増殖活性または血糖降下作用を有する新規なTSA7005遺伝子が提供される。本発明遺伝子は、Reg蛋白と類似性を有し、脾臓、小腸、大腸、精巣組織に特異的に発現し、特に脾臓においてその発現量が高く、また正常末梢血または正常リンパ球において発現が認められることより、脾臓の脾β細胞における脾β細胞増殖活性または血糖降下作用を有すると考えられる。また、本発明遺伝子の提供によれば、該遺伝子がコードするポリペプチドを遺伝子工学的に大量に製造することができ、該ポリペプチドの提供によれば、TSA7005活性やTSA7005ポリペプチド結合活性などの機能を調べることもできる。

【0217】またTSA7005ポリペプチドは、本発明遺伝子およびその発現産物が関与する疾患（例えば脾臓、小腸、大腸、精巣における発現遺伝子構造に関連する疾患や癌や糖尿病、特に糖尿病）の病態解明や診断、治療などに有用である。

【0218】更に本発明遺伝子は該遺伝子の発現を所望の脾β細胞において高める遺伝子治療法に、または遺伝子治療剤として有用である。即ち、本発明によれば、さらにTSA7005遺伝子のセンス・オリゴヌクレオチド（ポリヌクレオチド）、これを含有する遺伝子治療のための遺伝子導入用ベクター、該センス・オリゴヌクレオチドを導入された細胞および該ベクターまたは細胞を有効成分とする遺伝子治療剤、並びにその利用による遺伝子治療法が提供される。

【0219】また、本発明は、かかる遺伝子によってコードされる新規なポリペプチドに対する特異抗体またはその断片およびこれらを有効成分とする診断剤も提供することができる。

【0220】また本発明によれば、脾臓の脾β細胞における脾β細胞増殖活性または血糖降下作用による糖尿病の処置に使用されるTSA7005遺伝子のポリヌクレオチド配列または部分配列のセンス・オリゴヌクレオチドまたはこれを保有するベクターを有効成分として含有する医薬も提供できる。

【0221】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

【0222】

【実施例1】(1-1) [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATPで標識した表出方法

組織特異的な手法において発現したヒト遺伝子を確認するために [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATPで標識した表出方法を用いた。該方法の手順は本質的に以下に示すリヤングの方法 (Liang P., et al., Science, 257, 967-971 (1992)) によった。

【0223】増幅されたcDNA断片のサブクローニングと精製は、オザキらの方法をいくらか修飾して行った(Ozaki, K., Genomics, 36, 316-319 (1996))。バックグラウンドからの標的バンドの精製のために再増幅した産物をビスベンズイミド-PEG複合体(H.A.Yellow: Hanse Analytik GmbH, ドイツ)を含む3%アガロースゲルで分離した。該複合体は、DNA断片のアデニン/チミン(A/T)塩基リッチ領域に対して結合し、適当なDNA断片をより正確に分離することができる。核酸配列は、ABI 377自動シークエンサー（パーキン・エルマー・アプライド・バイオ・システムズ社製）によって決定した。

【0224】13のヒト組織（成人脳、肺、肝臓、脾臓、心臓、骨格筋、乳腺、前立腺、胃、脾臓、甲状腺、腎臓および脂肪組織：クローネック社製）の各々から単離したポリAmRNA (0.2  $\mu$ g)を、ジエチルピロカーボネート処理された水8  $\mu$ l中で、3'-アンカード・オリゴdTプライマーG (T) 15MA (MはG、AおよびCの混合液である)の25 pmolと混合し、65°Cで5分間加熱した。この溶液に4  $\mu$ lの5×ファースト・ストランド緩衝液 (BRL社製)、2  $\mu$ lの0.1 MDTT (BRL社製)、1  $\mu$ lの250 mM dNTPs (BRL社製)、1  $\mu$ lのリボヌクレアーゼ・インヒビター (40単位; TOYOB0社製)および1  $\mu$ lのスーパースクリプトII逆転写酵素 (200単位; BRL社製)を加えた。各反応液の最終容量は20  $\mu$ lとした。各溶液を37°Cで1時間培養した後、30  $\mu$ lの蒸留した水の付加により2.5倍までに希釈し、使用時まで-20°Cで貯蔵した。

【0225】cDNAは、 [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATPで標識した（アマシャム社製）3'-アンカード・プライマーの存在下でのPCRにより増幅させた。このcDNAのPCR増幅は、以下のとおり実施された。

【0226】即ち、各20  $\mu$ lのPCR混合液は、2  $\mu$ lのRT反応混合液、2  $\mu$ lの10×PCR緩衝液（タカラ社製）、4  $\mu$ lの2.5 mM dNTPs、0.25  $\mu$ lのEx Taq DNAポリメラーゼ (5単位/m1: タカラ社製)、 [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATPで標識した25 pmolの3'-アンカード・オリゴ-dTプライマー（配列番号：4）および25 pmolの5'-プライマー（配列番号：5）を含んでいた。

【0227】また、PCR反応は以下の条件で行った。即ち、95°Cで3分間、40°Cで5分間および72°Cで5分間を1サイクルとして行い、それから95°Cで0.5分間、40°Cで2分間および72°Cで1分間を40サイクル行い、最後に72°Cで5分間反応させた。

【0228】PCR反応サンプルをエタノールで抽出し、フォルムアミド・シークエンシング染料中に再懸濁して、ビスベンズイミド-PEG複合体を含む3%アガロースゲル上で反応させた。ゲルは固定することなしに

乾燥させ、一晩オートラジオグラフィーを実施した。  
(1-2) 増幅されたcDNA断片のサブ・クローニング  
予め乾燥ゲルを載せた3MM沪紙上にラディオアクティ  
ブインクで印を付けておき、これとオートラジオグラム  
をあわせることにより、目的のcDNAを含むバンドが  
含まれるゲルを、3MM沪紙ごと切り出した後、300  
μlのdH<sub>2</sub>Oにて1時間攪拌した。ポリアクリルアミ  
ド・ゲルと沪紙を取り除いた後、cDNAを担体として  
1μlの10mg/mlグリコーゲンと0.3MNaO  
Acの存在下に、エタノール沈澱によって再回収し、1  
0μlのdH<sub>2</sub>Oに再溶解した。再増幅のために、5μ  
lのこの溶液が用いられた。PCRの条件とプライマー  
は最初のPCRに対してと同じとした。適当な大きさの  
再増幅産物を第一のPCR産物として再回収し、それか  
らそのPCR産物をpUC118ベクター(タカラ社製)  
のHinc II部位にクローニングした。核酸配列はAB  
I 377自動シーケンサー(バーキン・エルマー・ア  
プライド・バイオ・システムズ社製)によって決定し  
た。

【0229】上記方法にて、ヒト膵臓組織から単離した  
mRNAを用いて異なる表出パターンを比較した結果、  
膵臓、小腸、大腸、精巢に特異的に発現した一つの29  
5塩基のcDNAからなるPCR産物を確認した。これをTSA7005DDと命名した。

【0230】FASTAプログラム(Person W. R., et  
al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448 (1  
988))を使用するGenBank/EMBLデータベース中のDNA配列と、このヌクレオチドのデータとの  
比較より、このPCR産物が他の如何なる公知のDNA  
配列とも相同性を有しないことが明らかとなった。(1-  
3) cDNAのスクリーニングTSA7005DDに相  
同する集合したcDNA配列(TSA7005)は、計  
算された分子量18.2kDaを有する158アミノ酸  
の蛋白をコードする474ヌクレオチドのオープン・リ  
ーディング・フレームを含む1060ヌクレオチドを含  
んでいた。

【0231】一次配列からこの遺伝子の産物(TSA7  
005蛋白質)は、N末端にシグナルペプチド様の配列  
があり、分泌蛋白であることが明らかとなった。

【0232】また、本発明遺伝子TSA7005は、ヒ  
ト、マウスおよびラットのReg蛋白質とそれぞれ32  
%、32%および34%のホモロジーを有していた。膵

β細胞はインスリンを産生し血糖レベルを一定に保つ働  
きをしており、膵β細胞の破壊性病変により1型糖尿病  
が発症することが知られている。Reg蛋白質は再生膵  
β細胞で発現が認められ、イン・ビトロ(in vitro)では  
膵β細胞の増殖を促進することが知られている。さらに  
Reg蛋白質とリノマイド(linomide)をNODマウスに  
投与することにより糖尿病が改善することが報告されて  
いる。これらのことから、TSA7005遺伝子発現産  
物またはTSA7005蛋白質は、膵β細胞の増殖を促  
進すると考えられ、糖尿病の新規治療剤または治療法の  
開発に役立つと考えられる。

## (2) 組織における発現

組織におけるTSA7005の発現プロファイルを調べ  
るため、各種のヒト組織を用いたノーザンプロット分析  
を行った。

【0233】ノーザン・プロット分析には、ヒトMTN  
(Multiple-Tissue Northern)プロットIとII(クロ  
ーンテック社製)を使用した。cDNA断片は、ランダム  
プライマー-DNAラベリングキット(random primer DN  
A labeling kit, ベーリングガーマンハイム社製)を用い  
て、<sup>32</sup>P-dCTPで標識した。プローブを含むメンブ  
ランをプレハイブリダイズ(条件は製品のプロトコール  
に従った)し、それから製品のプロトコールに従い、ハ  
イブリダイゼーションを行った。

【0234】ハイブリダイゼーション後、洗浄した膜を  
-80°Cで24時間オートラジオグラフに露光した。そ  
の結果は図1に示すとおりである。

【0235】該図において、用いたヒト組織は、心臓  
(Heart)、脳(brain)、胎盤(Placenta)、肺(Lun  
g)、肝臓(Liver)、骨格筋(S. muscle)、腎臓(Kid  
ney)、膵臓(Pancreas)、脾臓(Spleen)、胸腺(Thy  
mus)、前立腺(Prostate)、精巢(Testis)、卵巣(O  
vary)、小腸(Small intestine)、結腸(Colon)およ  
び末梢血白血球(Peripheral blood leukocyte; P.B.  
L.)である。

【0236】該図より、TSA7005に相同する1.3  
5キロ塩基のバンドからなる転写体が膵臓(Pancrea  
s)、小腸(Small intestine)、結腸(Colon)および  
精巢(Testis)において特異的に観察された。

## 【0237】

### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110>; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.  
<120>; TSA7005 gene  
<130>; 1869JP  
<140>;  
<141>;  
<160>; 5  
<170>; PatentIn Ver. 2.0

<:210>; 1  
 <:211>; 158  
 <:212>; PRT  
 <:213>; Unknown  
 <:400>; 1  
 Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg Pro Ser Cys Ala Pro  
 20 25 30  
 Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg Lys Leu  
 35 40 45  
 Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr Gly Asn Gly  
 50 55 60  
 Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr Ile Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro Ile Trp Ile Gly Leu  
 85 90 95  
 His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp Ile Asp Gly Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met Gly Gly Asn Lys His  
 115 120 125  
 Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser Ser Asn  
 130 135 140  
 Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro  
 145 150 155  
 <:210>; 2  
 <:211>; 474  
 <:212>; DNA  
 <:213>; Unknown  
 <:220>;  
 <:221>; CDS  
 <:400>; 2  
 atggcttcca gaagcatgcg gctgtccata ttgctgagct gcctggccaa aacaggagtc 60  
 ctgggtgata tcatcatgag acccagctgt gctcctggat gttttacca caagtccaat 120  
 tgcgtatgtt acttcaggaa gctgaggaac tggctctatc ccgagctcgat gtgtcagtct 180  
 tacggaaacg gagccccaccc ggcattatac ctgatgtttaa aggaagccag caccatagca 240  
 gatgtatataa gtggctatca gagaagccag ccgatatggta ttggcctgca cgaccacag 300  
 aagaggcagc agtggcagtg gattgtatggc gccatgtatc tgtacagatc ctggctggc 360  
 aagtccatgg gtggaaacaa gcaactgtgtc gagatgagct ccaataacaa ctttttaact 420  
 tggagcagca acgaatgcaa caagcgccaa cacttcctgt gcaagtaccg acca 474  
 <:210>; 3  
 <:211>; 1060  
 <:212>; DNA  
 <:213>; Unknown  
 <:220>;  
 <:221>; CDS  
 <:222>; (67)..(540)  
 <:400>; 3  
 ttcggaaatcg cgcttagtaag gtctctgaga tccttgact agctacatcc tcaggtagg 60  
 aggaag atg gtc tcc aga agc atg cgg ctg ctc cta ttg ctg agc tgc 108

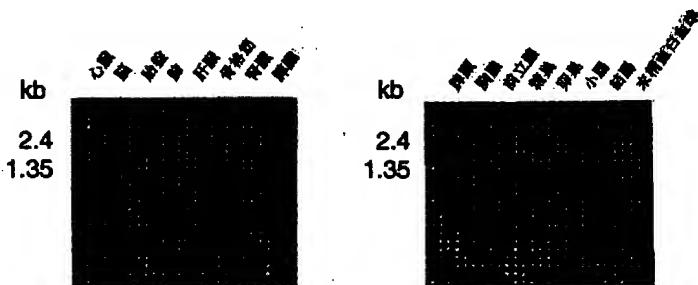
Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Ser Cys  
 1 5 10  
 ctg gcc aaa aca gga gtc ctg ggt gat atc atc atg aga ccc agc tgt 156  
 Leu Ala Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg Pro Ser Cys  
 15 20 25 30  
 gct cct gga tgg ttt tac cac aag tcc aat tgc tat ggt tac ttc agg 204  
 Ala Pro Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg  
 35 40 45  
 aag ctg agg aac tgg tct gat gcc gag ctc gag tgt cag tct tac gga 252  
 Lys Leu Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr Gly  
 50 55 60  
 aac gga gcc cac ctg gca tct atc ctg agt tta aag gaa gcc agc acc 300  
 Asn Gly Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr  
 65 70 75  
 ata gca gag tac ata agt ggc tat cag aga agc cag ccg ata tgg att 348  
 Ile Ala Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro Ile Trp Ile  
 80 85 90  
 ggc ctg cac gac cca cag aag agg cag cag tgg cag tgg att gat ggg 396  
 Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp Ile Asp Gly  
 95 100 105 110  
 gcc atg tat ctg tac aga tcc tgg tct ggc aag tcc atg ggt ggg aac 444  
 Ala Met Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met Gly Gly Asn  
 115 120 125  
 aag cac tgt gag atg agc tcc aat aac aac ttt tta act tgg agc 492  
 Lys His Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser  
 130 135 140  
 agc aac gaa tgc aac aag cgc caa cac ttc ctg tgc aag tac cga cca 540  
 Ser Asn Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro  
 145 150 155  
 tagagcaaga atcaagattc tgcttaactcc tgacacgccc cgtcccttc ctttcgtcta 600  
 gcctggctaa atctgctcat tatttcagag gggaaaccta gcaaactaag agtgataagg 660  
 gcccctactac actggctttt ttaggcttag agacagaaaat tttagcattg gcccagtagt 720  
 ggtttcttagc tctaaatgtt tgcccccgc tcccttcca cagtatcctt cttccctcct 780  
 cccctgtctc tggctgtctc gagcagtcta gaagagtgc tctccagcct atgaaacagc 840  
 tgggtctttg gccataagaa gtaaaagattt gaagacagaaa ggaagaaaact caggagtaag 900  
 cttctagmcc ctttcagctt ctacaccctt ctgccttc tccattgcct gcacccacc 960  
 ccagccactc aactcctgct tggccatrgaaggttac cagtagaaatc 1020  
 cttgttaggt tgatgtggc catacattcc tttataaaaa 1060  
 <:210>; 4  
 <:211>; 16  
 <:212>; DNA  
 <:213>; Unknown  
 <:400>; 4  
 tttttttttt ttttha 16  
 <:210>; 5  
 <:211>; 10  
 <:212>; DNA  
 <:213>; Unknown  
 <:400>; 5  
 cctgtatcga 10

## 【図面の簡単な説明】

【図1】組織におけるTSA7005の発現プロファイル

ルを調べるために実施例1(2)に従い行われた各種のヒト組織を用いたノーザンプロット分析結果を示す図面である。

【図1】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	マークコード(参考)
C 1 2 N 5/10		A 6 1 K 31/00	6 0 3 N
// A 6 1 K 31/00	6 0 3	48/00	
38/00		C 1 2 P 21/02	C
48/00		C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/02	

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09  
 DA01 DA02 DA05 DA11 GA11  
 HA13 HA14  
 4B064 AG01 CA01 CA19 CC01 CC24  
 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA57X AA58X AA72X  
 AA87X AA93Y AB01 AC14  
 BA02 CA24 CA43 CA44 CA46  
 4C084 AA07 AA13 BA01 BA22 DB52  
 DC50 MA17 MA22 MA23 MA35  
 MA37 MA41 MA43 MA44 MA52  
 MA66 ZC352  
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 EA20  
 EA50 FA74